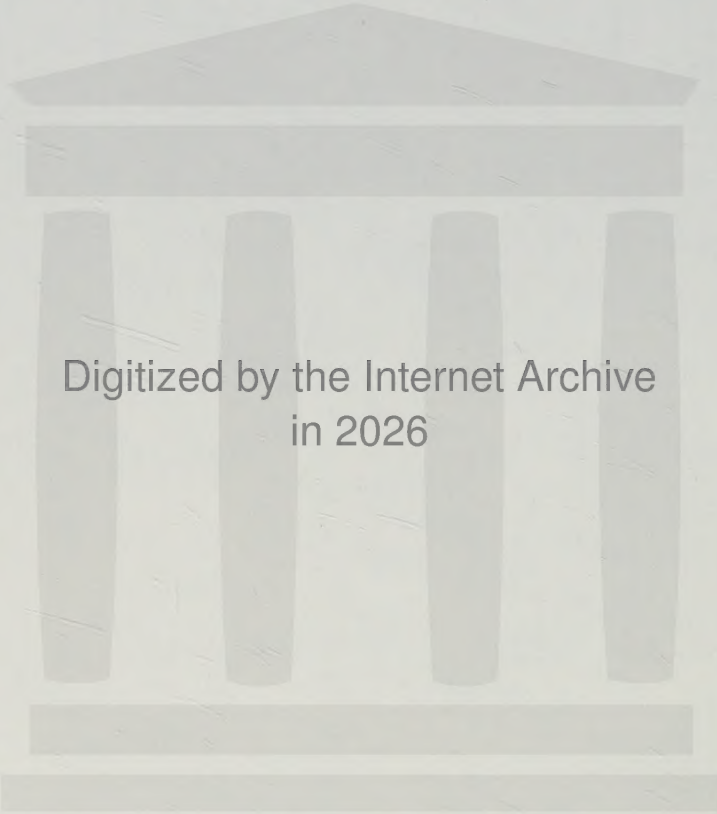


**ZUR IMMUNOIDENTITÄT VON THYREOIDEA
STIMULIERENDEM HORMON DER
MENSCHLICHEN HYPOPHYSE**

Wolfgang May

1975



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551907_0042

AUS DER II. MEDIZINISCHEN KLINIK DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

DIREKTOR PROFESSOR DR. EBERHARD BUCHBORN

ZUR IMMUNOIDENTITÄT VON THYREOIDEA STIMULIERENDEM HORMON
DER MENSCHLICHEN HYPOPHYSE

INAUGURALDISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE IN DER GESAMTEN MEDIZIN

AN DER

LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT

ZU MÜNCHEN

vorgelegt von

WOLFGANG MAY

aus Kreuth

1975

Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SFB 51)

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der
Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. P.C. Scriba
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. E. Buchborn
Dekan:	Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 16. Dezember 1975



Meine Verehrten Eltern, Frau Maria Anna
für die Überlassung des Hauses und für seine
sicherliche Liebe.

Meine ganz besondere Liebe und Sorge ist auch
meiner Frau, Maria Anna, und ich bin immer bereit
zu dienen und zu helfen.

Meine Eltern, Maria Anna und ich, haben
und werden in Zukunft auch die besten Teile der
Welt, die wir haben, zu unserer Verfügung haben.
Meine Eltern, Maria Anna und ich, haben
auch die besten Teile der Welt, die wir haben,
zu unserer Verfügung haben.

MEINEN ELTERN

Herrn Professor Dr.med. P.C. Scriba danke ich für die Überlassung des Themas und für seine tatkräftige Hilfe.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr.rer.nat. Dr.med. F. Erhardt, der mir bei dieser Arbeit unermüdlich zur Seite stand.

Besonders herzlich möchte ich Fräulein I.zur Horst und Fräulein D. Koeppen danken, die einen Teil der TSH-Assays durchführten. Fräulein Glöckner, Fräulein Schuhmacher und Herrn Gallenberger möchte ich für die Bestimmung von LH, Prl und GH recht herzlich danken.

LISTE DER ABKÜRZUNGEN

Ges. Prot.	Gesamt Protein
ACTH	Adenocorticotropes Hormon
GH	Wachstumshormon
Prl	Prolactin
TSH	Thyreotropin
LH	Luteinisierungshormon
MSH	Melanozyten stimulierendes Hormon
FSH	Follikel stimulierendes Hormon
hCG	Choriongonadotropin
T ₃	Trijodthyronin
T ₄	Thyroxin
TRH	Thyreotropin releasing Hormon
HVL	Hypophysenvorderlappen
HWZ	Halbwertszeit
I.E.	Internationale Einheit
s	Standardabweichung
$\bar{x}$	Mittelwert
VK	Variationskoeffizient
B	Bindung
B ₀	Standardleerwert (100 % gesetzt)
N	Unspezifische Bindung
KN	Niedrige Kontrolle
KM	Mittlere Kontrolle
KH	Hohe Kontrolle
EK	Eichkurve
WK	Wiederfindekurve
W ₀	Leerwert der Wiederfindekurve (100 % gesetzt)
W _N	Unspezifische Bindung des TSH-armen Serums
M	Molare Bindung
C	Counts = Zählrate

Inhaltsverzeichnis

Seite

<u>1.</u>	<u>EINLEITUNG</u>	1
1.1.1.	TSH = Thyreotropin = Schilddrüsen-stimulierendes Hormon des Hypo-physenvorderlappens	1
1.1.2.	Biologische Wirkungen des TSH	1
1.1.3.	Die Struktur des TSH	2
1.2.	TRH = Thyreotropin releasing Hormon	2
1.2.1.	Biologische Wirkungen des TRH	3
1.3.	Diagnostische Bedeutung der TSH-Bestimmung bei TRH-Belastung	3
1.4.	Tabelle der TSH-Normalwerte nach Erhardt et al.	4
<u>2.</u>	<u>PROBLEMSTELLUNG</u>	5
<u>3.</u>	<u>METHODEN</u>	6
3.1.	Material, Reagenzien und Lösungen	6
3.1.1.	Für den Assay	6
3.1.2.	Für die Markierung	8
3.1.3.	Für die Chromatographie von Hypophysenüberständen	8
3.1.4.	Für die Proteinbestimmung	9
3.1.5.	Für die TRH-Infusionen	9
3.2.	Radioimmunologische TSH-Bestimmung	9
3.2.1.	Allgemeines Prinzip und zur graphischen Darstellung von Standardkurven	9
3.2.2.	TSH-Markierung mit ^{125}Jod	11
3.2.2.1.	Das Isotop ist wie folgt charakterisiert	11
3.2.2.2.	Markierung nach GREENWOOD und HUNTER	12
3.2.2.3.	Methodik	12

	Seite
3.2.2.4.	Jodierung 13
3.2.2.5.	Berechnung der spezifischen Aktivität 13
3.2.2.6.	Zählgeräte 15
3.3.	Radioimmunoassay 16
3.3.1.	TSH-Eich- und Wiederfindekurve 16
3.3.2.	Kurzversuch zur Bindung des Tracers 17
3.3.3.	Durchführung des Assays 17
3.3.4.	Inkubationszeit, Temperatur und Titration der Antikörper 19
3.3.5.	Auftauversuch 19
3.3.6.	Hämolysen 21
3.3.7.	Bestimmung von T_3 -absolut und T_4 22
3.4.	Qualitätskontrolle 22
3.4.1.	Qualitätskontrolle durch Wiederfindekurven im Humanserum 22
3.4.2.	Präzision (Streubreite) 22
3.4.2.1.	Kontrollwerte 23
3.4.3.	Sensitivität 23
3.4.4.	Verdünnungseffekt 25
3.5.	Chromatographie von menschlichen Hypophysenhormonen 25
3.5.1.	Freisetzen der Hormone 25
3.5.2.	Chromatographie des Überstands homogenisierter Hypophysen 25
3.5.2.1.	Elutionsmedium 25
3.5.2.2.	Vorbereitung der Sephadex G-100 Säule 26
3.5.2.3.	Der KAV-Wert 26
3.5.2.4.	Im Eluat gemessene Substanzen: Gesamtprotein, TSH, LH, Prl, GH und ACTH 26

3.5.3.	Messung von Gesamtprotein im Elutionsprofil	27
<u>4.</u>	<u>ERGEBNISSE</u>	29
4.1.	Untersuchungen zur Immuno- reaktivität von TSH	29
4.1.1.	Standardpräparationen	29
4.1.1.1.	NIH-TSH	29
4.1.2.	TRH-Infusionen	32
4.1.2.1.	TSH-Antwort auf Stimulation mit 1000 µg TRH	32
4.1.2.2.	T ₃ - und T ₄ -Werte bei Infusion von 1000 µg TRH	32
4.1.3.	Verdünnungsreihen von peripherem TSH (Patientenserum) in Puffer B und supprimiertem Serum nach Stimulation mit TRH	38
4.1.4.	Verdünnungskurven des Serums von Normalpersonen	38
4.1.4.1.	Mittelwerte	38
4.1.4.2.	Einzelwerte	41
4.1.4.3.	Richtigkeitskontrolle der TSH-Verdünnungskurven	44
4.1.5.	Verdünnungskurven des Serums hypothyreoter Patienten	44
4.1.6.	Normalkollektiv	44
4.2.	Säulenchromatographie von Hypophysenüberständen nach Homogenisieren und Zentri- fugation	47
4.2.1.	Im Überstand vorhandenes Protein	47
4.2.1.1.	Messung von Gesamtprotein	47
4.2.1.2.	TSH-Peak	47
4.2.1.3.	LH	48
4.2.1.4.	ACTH	48

		Seite
4.2.1.5.	GH	48
4.2.1.6.	Prl	48
4.2.2.	Die Immunoidentität des TSH aus Hypophysenüberständen	48
<u>5.</u>	<u>DISKUSSION</u>	51
<u>6.</u>	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	54
<u>7.</u>	<u>LITERATUR</u>	56

1. EINLEITUNG

1.1.1. TSH = Thyreotropin = Schilddrüsen-stimulierendes Hormon des Hypophysenvorderlappens

TSH ist ein Glykoproteidhormon mit ca. 15 % Kohlenhydratanteil. Es wird von den acidophilen Zellen des HVL gebildet (31). Ebenso wie LH, FSH und hCG besteht es aus zwei Untereinheiten, wobei die α -Einheit von TSH und LH in ihrer Sequenz identisch und untereinander austauschbar sind (49). Die biologische und immunologische Spezifität liegt in den β -Ketten (32, 48). Die HWZ von endogenem TSH wird mit 90 - 130 min angegeben, während exogenes TSH nur 39 - 68 min im Organismus nachweisbar bleibt. Die tägliche Produktionsrate beträgt 150 - 300 mE, was etwa der Hälfte des Gehalts der Hypophyse entspricht (39, 43).

1.1.2. Biologische Wirkungen des TSH

An der Schilddrüse steigert TSH den Jodidtransport aus dem Blut in die Schilddrüsenzelle, fördert die organische Bindung des transportierten Jods (d.h. seine Inkorporation in die Tyrosinreste des Thyreoglobulins) und steigert die Proteolyse des Thyreoglobulins (und damit die Sekretion der Hormone). Die Speicherung von Thyreoglobulin dagegen ist eine autonome Eigenschaft der Schilddrüse, die nur in Abwesenheit von TSH stattfindet. Daher führt TSH-Stimulation zur Kolloidverarmung und zum hyperplastischen Kropf. TSH führt zu einer Volumenvermehrung der Schilddrüse, weil das Volumen jeder Follikelzelle und wahrscheinlich auch die Zahl der Follikel zunehmen. Der HVL reagiert schon auf einen mit den üblichen Methoden nicht messbaren Abfall der T_4 -Konzentration im Blut mit einer Mehrsekretion von TSH. Das TSH treibt die Kette von Reaktionsschritten in der Hormonsynthese an und bringt die Blutkonzen-

tration von T_3 und T_4 wieder zurück auf das ursprüngliche Niveau (56, 58).

1.1.3. Die Struktur des TSH

Die Struktur der bovinen α -Kette war schon seit einiger Zeit bekannt (32, 48). Die Struktur der humanen β -Kette konnte erst 1973 durch B.SHOME et al. (54) entschlüsselt werden.

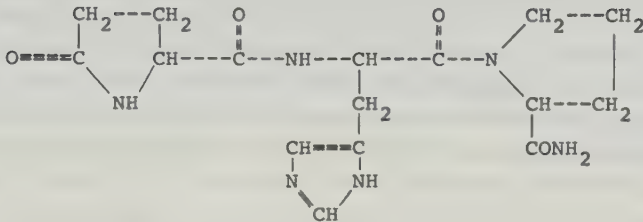
Abb.1: hTSH- β -Subunit.

H-Phe-Cys-Ile-Pro-Thr-Glx-Tyr-(Met.Thr.His.Val.Glx)-Arg-Arg-Glx-Cys-Ala-Tyr-Cys-Leu-Thr-Ile-Asn-(CHO)-Thr-Thr-Ile-Cys-(Ala.Gly.Tyr.Cys.Met.Glx.Ser.Thr)-Arg-Asx-Ile-Asx-Gly-Lys-Leu-Phe-Leu-Pro-Lys-Tyr-Ala-Leu-Ser-Glx-Asx-Val-Cys-Thr-Tyr-Arg-Asp-Phe-Ile-Tyr-Arg-Thr-Val-Glx-Ile-Pro-Gly-Cys-Pro-Leu-His-Val-(Ala.Pro.Tyr)-Phe-Ser-Tyr-Pro-Val-(Ala.Leu.Ser.Cys)-Lys-Cys-Gly-Lys-Cys-Asx-Thr-Asx-Tyr-Ser-Asx-Cys-Ile-His-(Glu.Alc.Ile)-Lys-Thr-Asx-Tyr-Cys-Thr-Lys-Pro-Glx-Lys-Ser-Tyr-OH

1.2. TRH = Thyreotropin releasing Hormon

1969 gelang die Aufklärung der Struktur des TRH durch J.BØHLER et al. (3), nachdem die immunologisch wie biologisch thyreotrope Aktivität hypothalamischer Extrakte vom Schwein und Schaf nachgewiesen war (1, 53). Es handelt sich um L-Pyro-Glutamyl-Histidyl-Prolinamid.

Abb. 2: Strukturformel des synthetischen TRH.



1.2. . Biologische Wirkungen des TRH

TRH ist oral und parenteral verabreicht wirksam (7, 8, 10). Die stimulierende Wirkung ist in vitro und in vivo durch Zufuhr von Schilddrüsenhormonen kompetitiv hemmbar (23). Die Substanz wird im menschlichen Serum bei 37° C in 15 min inaktiviert (6). In vitro wird durch TRH sowohl die Freisetzung als auch die Neusynthese von TSH stimuliert (36). TRH hat keine stimulierende Wirkung auf die Freisetzung von GH, MSH, LH, FSH und ACTH bzw. Cortisol (2, 34). Jedoch wurde über eine Prolactin-stimulierende Wirkung berichtet (5).

1.3. DIAGNOSTISCHE BEDEUTUNG DER RADIOIMMUNOLOGISCHEN TSH-BESTIMMUNG BEI TRH-BELASTUNG

Hyperthyreote Patienten reagierten nicht auf TRH (TSH nicht messbar und supprimiert) (38, 44). Normale und hypothyreote Patienten reagieren auf TRH mit einem Anstieg der TSH-Sekretion und einem Prolactinanstieg (5). Somit bietet sich die TSH-Bestimmung nach TRH-Belastung im Vergleich mit der Bestimmung der basalen TSH-Spiegel als ergänzendes diagnostisches Prinzip in der Schilddrüsendiagnostik (46) an.

1.4. TABELLE DER TSH-NORMALWERTE NACH ERHARDT et al.(14)

Basalwert: 0 - 3,8 μ E TSH ($\bar{x}_{lin.} \pm 2 s$)

Δ TSH 30' nach Stimulation mit 200 μ g TRH schnell i.v.:

2,7 - 23,6 μ E TSH ($\bar{x}_{lin.} \pm 2 s$)

Bei der Hypothyreose sind die Basalwerte in der Regel bereits erhöht. Der regulativ sehr starke Anstieg der Serum-TSH-Werte nach Stimulation mit TRH erlaubt eine sichere und frühzeitige Diagnose (46).

Bei der blanden Struma sind Basalwerte und stimulierte Werte in 80 % der Fälle normal, in 20 % erhöht (46).

Hyperthyreote Patienten reagieren nicht auf TRH. TSH ist endogen supprimiert. Der gleiche Effekt kann durch Überschuss an Schilddrüsenhormongaben erreicht werden (46).

2. PROBLEMSTELLUNG

In dieser Arbeit wird die Immunoidentität von TSH im Vergleich zu internationalen Standardpräparationen untersucht. Es lag daran, festzustellen, ob wir in unserem Assay nur immunologisch einheitlich reagierendes Hormon messen, oder ob endogen durch TRH-Langzeit-Stimulation sezerniertes TSH nicht immunoidentisch reagiert und damit einen Hinweis für Vorstufen gibt. So wurde z.B. von M. GOTTSMANN (20) beim Insulinhypoglykämietest eine Abweichung von der Parallelität mit Standardkurven in der Verdünnungsreihe des 90' Wertes beim Wachstumshormon (GH) gefunden. Es soll hier geprüft werden, ob bei einer Infusionsdauer von 240' mit insgesamt 1000 ug TRH ähnliche Abweichungen für das TSH zu finden sind. TSH enthaltende Eluate von Hypophysenextrakten nach Säulenchromatographie sollten ebenfalls auf Immunoheterogenität in Verdünnungskurven untersucht werden.

3. METHODEN

3.1. MATERIAL, REAGENZIEN UND LÖSUNGEN

3.1.1. Für den Assay:

Puffer A Stammlösung (10fache Konzentration) :

- 0,15 M Phosphat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, Merck Nr. 6346)
- 1,5 M NaCl (Merck Nr. 6404)
- 0,2 % Merthiolat (2 g, Thimerosal, Schuchardt, München)
- 2,0 % Rinderalbumin (20 g, Pentex, Fulka, Buchs/Schweiz)
- 0,1 M EDTA (37,2 g Titriplex III, Merck Nr. 5432)

mit 800 ml Aqua dest. lösen und mit 1 n NaOH auf pH 7,4 einstellen. Ad 1000 ml mit Aqua dest. auffüllen.

Puffer A Gebrauchslösung:

200 ml Stammlösung mit 1700 ml Aqua dest. auffüllen, pH 7,4 einstellen und auf 2000 ml auffüllen.

Puffer B Stammlösung:

Puffer B Stammlösung = Puffer A ohne EDTA.

Puffer B Gebrauchslösung:

Puffer B Stammlösung mit 4,2 g Rinderalbumin / 100 ml auf 7,4 pH einstellen.

Puffer C:

- 0,15 M NaCl (Merck Nr. 6404)
- 0,015 M Natriumphosphat (Merck Nr. 6346), pH 7,4.

Puffer D:

- 0,4 M Natriumphosphat (Merck Nr. 6346), pH 7,4.

Ak-I-Lösung = Antikörper-I-Lösung:

- 50 µl Anti-TSH 1:100 (in dieser Konzentration eingefroren und gelagert, ausreichend für 100 Proben) (NIAMD, Bethesda)
- 1000 I.E. hCG (Primogonyl, Schering AG, Berlin)
- 0,04 ml Kaninchenserum (Kaninchennormalserum von Kaninchen im Hause)

ad 60 ml mit Puffer A auffüllen.

Ak-II-Lösung = Antikörper-II-Lösung (präzipitierender Antikörper) :

Anti-rabbit-precipitating-serum (Fa. Welcome, lot. K 3437, Donkey) 1:50 oder lot K 6024 1:25 mit Puffer A verdünnt.

TSH-Standard:

0,25 ml TSH-Standardlösung (10 mE/ml human pituitary TSH 68/38 NIMR, Mil Hill London) wurden in Eppendorfgläsern eingefroren (bei -30°C).

0,2 ml TSH-Stammlösung werden mit 19,8 ml Puffer B auf 20 ml verdünnt = 100 uE TSH/ml. Davon wird eine Verdünnungsreihe = Eichkurve erstellt.

Durch Zufügen von TSH-Standard zu TSH-armem Serum stellt man sich entsprechend die Wiederfindungskurve her.

Kaninchenserum 20 % :

Kaninchennormalserum von Kaninchen im Hause 1:5 mit Puffer C verdünnen, je 1 ml in Eppendorfgläser füllen und bei -30°C einfrieren.

Lösung zur Bestimmung der unspezifischen Bindung:

0,08 ml Kaninchennormalserum mit 100 ml Puffer A mischen + 2000 I.E. hCG (Primogonyl, Schering AG, Berlin) gelöst in 0,2 ml Aqua dest. auf 120 ml mit Puffer A auffüllen (pH 7,4).

TSH-armes Serum:

Es wurde Serum von nicht TSH-stimulierbaren Patienten verwendet (hyperthyreote, dekompensierte autonome Adenome, hypophysectomierte und T_3 -supprimierte Patienten).

Automatische Pipette:

Fisons Diluter, Fa. IMA, München.

Hamilton Spritze:

Fa. Hamilton, California, USA.

Klebefolie:

Folioplast Schwarz, Kunststoff.

3.1.2. Für die Markierung:

^{125}Jod (Na^{125}J , Farbwerke Höchst AG, Frankfurt/M) in
Portionen zu 0,5 mCi.
2,5 μg TSH (NIAMD, Bethesda) in silikonisierten Glasröhrchen
bei -30°C eingefroren.
Chloramin T (Merck Nr. 2426) 25 mg in 20 ml Plastikröhrchen.
 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ (Merck Nr. 6528) 25 mg in 20 ml Plastikröhrchen.
Kaliumjodid (Merck Nr. 5043) 100 mg in 20 ml Puffer C.
G-75 Sephadex Säule auf Stativ (Sephadex G-75, Pharmacia,
Uppsala). Innendurchmesser 1 cm, Glas selbstausgezogen,
Länge 12 - 15 cm.
Eppendorfpipetten zu 5, 10, 20 und 50 μl mit Spitzen.
Zwei 10 ml-Messpipetten.
Lange Glaskapillare mit Peläusbällchen.
Einmalhandschuhe und Pinzette.
30 Eppendorfgefäße mit je 20 μl Puffer B.
Fraktionssammler (Eigenbau), Fa. Ismatec, Zürich/Schweiz.
Rüttler: Rotamixer, Hock & Stucker Ltd., London/England.
 γ -Zählgerät: Gamma Guard, Fa. Tracerlab.
Geigerzählrohr: Fa. Friesseke und Höpfner, Erlangen/Bruck.
Spitzglas und Schreibpapier.

Silikonisieren der Gefäße:

Die Glasgefäße (Fassungsvermögen 0,1 ml) wurden mit Seife
und Aqua dest. gereinigt und anschliessend 30 min in Silikon-
lösung gelegt (Silikonlösung, Fa. Serva Nr. 35130). Sie wurden
1 Stunde im Trockensterilisator bei 180° sterilisiert.

3.1.3. Für die Chromatographie von Hypophysenüberständen:

Mörser: Micro-Desmembrator (Fa. Braun, Melsungen) oder manueller
Keramikmörser.
Zentrifuge: Ecco Serva 16, Fa. Serva, Zürich.
Fraktionssammler: Serva Linear II, Fa. Serva, Zürich.

G-100 Säule: Glas, selbstausgezogen, Innendurchmesser 3 cm,
Länge 130 cm.

Gel: Sephadex G-100 (Pharmacia, Uppsala, Schweden).

Säulendaten: Das Gel war vom Ausfluss der Säule bis zum
Konus 115 cm hoch aufgefüllt und mit 20 ml Puffer
B deaktiviert.

KAV 0 = 190 ml; KAV 1 = 690 ml; Durchlaufgeschwindigkeit =
124,4 Std.

Fraktion: 5 ml = 67 Tropfen.

3.1.4. Für die Proteinbestimmung:

Standard: Rinderalbumin, reinst (Fa.Boehringer, Mannheim),
1 mg = 1,165 Extinktionseinheiten (bei 280 nm),
1 Extinktionseinheit = 0,67 mg Protein/ml.

Schichtdicke der Küvette: 1,0 cm.

Photometer: Zeissphotometer.

Proteinbestimmung nach LOWRY : Na_2CO_3 (Merck Nr. 6392),
 CuSO_4 (Merck Nr. 2790),
Folin Reagenz (Merck Nr.3984).

3.1.5. Für die TRH-Infusionen:

TRH: Hoechst AG, Frankfurt a.M.

0,9 % NaCl der Hausapotheke.

Infusionsregulierung mit Infusomat (Fa.Braun, Melsungen).

Infusionen und Blutentnahmen erfolgten durch eine Braunüle
oder eine Kanüle Nr. 1.

3.2. RADIOIMMUNOLOGISCHE TSH-BESTIMMUNG

3.2.1. Allgemeines Prinzip und zur graphischen Darstellung von Standardkurven

1960 wurde von YALOW und BERSON (63) die radioimmunologische
Isotopenverdünnungsmethode zur Messung von Seruminsulinspiegeln
eingeführt. Mit Hilfe dieser Methode war es erstmals möglich,

Konzentrationen im Nano- bis Picogrammereich zu messen. Sie beruht auf der Konkurrenz von radioaktiv markiertem Antigen (z.B. $^{125}\text{Jod-TSH}$) um die Bindungsstellen am Antikörper mit unmarkiertem Antigen. Die Reaktion folgt dem Massenwirkungsgesetz, wobei allerdings markiertes und unmarkiertes Antigen nicht vollkommen gleich reagieren (19). Antikörpergebundenes, markiertes (bound) Antigen ist umgekehrt proportional der Menge des zugegebenen unmarkierten Antigens. So lässt sich bei bekannten Konzentrationen des Antigens, bei konstanter Antikörpermenge und konstanter Menge zugesetzten markierten Antigens, eine Eichkurve aufstellen, an der die Konzentration des Antigens einer unbekannten Probe abgelesen werden kann (25). Dies setzt voraus, dass der Antigen-Antikörperkomplex vom freien Antigen getrennt worden ist. Nach CATT (10) stehen uns hierzu drei Trennungsmethoden zur Verfügung:

1. Trennung durch verschiedene Mobilität von "bound" und "free", z.B. Chromatographie, Elektrophorese, Gelfiltration.

2. Trennung durch verschiedene selektive Entfernung des Antigen-Antikörperkomplexes, z.B. Doppelantikörpermethode, Salzpräzipitation, Solid-Phase-Methode.

3. Trennung durch Absorption des freien Antigens, z.B. Ionenaustauscher, Aktivkohle, Talkum.

In unserem Fall wurden "bound" und "free" mit Hilfe der Doppelantikörpermethode modifiziert nach ERHARDT et al. (14) getrennt.

Bei der von YALOW und BERSON (63) verwendeten Eichkurve sind Abszisse und Ordinate linear. An der Abszisse wird die Konzentration der "Antigenmenge", an der Ordinate der Quotient aus den Zählraten von "bound" und "free" aufgetragen. Die resultierende Funktion gleicht einer Hyperbel.

Bei unserer Bestimmung bildeten wir den Quotienten B/B_0 , wobei jeweils die unspezifische Bindung N, sowie der Leerwert

des Gerätes abgezogen wurden. Die Kurve beginnt somit bei $B - N/B_0 - N \times 100(\%)$. Zur statistischen Auswertung ist es jedoch nötig, die Abszisse in dekadische Logarithmen einzuteilen. Es resultiert mehr oder weniger eine Gerade zwischen den Standardkonzentrationen 2,0 - 20,0 uE TSH. Um die Genauigkeit zu erhöhen und die Länge der Geraden und somit den vergleichbaren Messbereich auszudehnen, wurde die LOGIT-Darstellung nach RODBARD et al. (51) verwendet.

Auf der Ordinate wird $\text{logit } B/B_0 = \frac{B/B_0}{1 - B/B_0}$;

die Funktion ist im Bereich $\text{logit } x_1 = -2,2$ bis $\text{logit } x_2 = +2,2$ linear. Das entspricht in unserem Test einer Standardkonzentration von etwa 1,0 - 40,0 uE TSH. Leider konnte nicht bei allen verwendeten Durchgängen ein derart breiter Messbereich verwandt werden. Eine vergleichende Darstellung folgt in Kapitel 4.1.1.1., Abb. 4.

3.2.2. TSH-Markierung mit ^{125}Jod

Um eine radioaktive Tracersubstanz zu erhalten, wird das Hormon, in unserem Fall das thyreoideastimulierende Hormon der Hypophyse (TSH), mit dem Jodisotop ^{125}Jod markiert.

3.2.2.1. Das Isotop ist wie folgt charakterisiert:

^{125}Jod zerfällt durch Elektroneneinfang in $^{125}\text{Tellur}$ unter Aussendung von γ -Strahlung. Die spezifische Aktivität des trägerfreien Isotops beträgt 57 Ci/g, die HWZ 60 Tage.

^{125}Jod wird gegenüber ^{131}Jod bevorzugt, weil der Isotopengehalt der käuflichen Präparate bei 80 - 100 % (^{131}Jod ca. 30 %) des Gesamtjods liegt und die HWZ länger ist (^{131}Jod 7 Tage).

3.2.2.2. Markierung nach GREENWOOD und HUNTER (22)

Bei der Markierung wird Jodid durch das Oxidationsmittel Chloramin T in elementares Jod umgewandelt, das die im Protein vorhandene Aminosäure Tyrosin in o-Stellung zur phenolischen Hydroxylgruppe substituiert. Als störende Nebenreaktion treten Oxidationsreaktionen, z.B. der SH-Gruppen auf, was zu dem damaged-hormone-Anteil beiträgt (52). Die Oxidation wird durch $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ gestoppt, das den Rest des freien Jods wieder zu Jodid reduziert. $^{125}\text{Jod-TSH}$ wird durch Chromatographie auf Sephadex G-75 vom freien Jodid isoliert.

3.2.2.3. Methodik

Vorbereitung der Sephadex G-75 Säule: 1 g Sephadex G-75 über Nacht in 20 ml Puffer C quellen; Säulenglasrohr reinigen, mit Äther vom Fett befreien und im Trockenschrank trocknen.

Rohr lotrecht im Stativ befestigen;

den Ausfluss der Säule mit einer Glasperle abdichten und, falls erforderlich, mit etwas Glaswolle oder feinen Glaskügelchen völlig abdichten.

Sephadex Gel etwa 12 - 15 cm hoch in das Glasrohr einfüllen (die Säulenlänge soll etwa 12 - 15 cm betragen, wenn sich das Gel gesetzt hat).

0,5 ml Puffer B auf die Säule geben und mit etwa 30 ml Puffer C nachspülen (Albumincoating).

Ausfluss des Glasrohres verschliessbar machen (Plastikschläuchlein überziehen und Klemme zurechtlegen).

Mit einem geeichten Gefäss prüfen, wieviele Tropfen 0,5 ml entsprechen.

Wenn keine Flüssigkeit mehr auf der Säule sichtbar ist, diese fest verschliessen.

Säule am Fraktionssammler befestigen und Lichtschränke desselben reinigen.

30 vorbereitete Eppendorfggefässe (mit je 0,02 ml Puffer B) in der Eppendorf-kette in den Fraktionssammler einfahren und die Funktion der Lichtschränke überprüfen.

3.2.2.4. Jodierung

^{125}Jod -Viole (2 mCi laut Angabe des Herstellers) kurz zentrifugieren, 80 μl Puffer D dazugeben und nochmals zentrifugieren.

Davon 20 μl (ca. 0,5 mCi) abpipettieren und in das Spitzglas einbringen.

Vor Markierungsbeginn Nullrate des Zählrohres bestimmen. Die Gesamtaktivität des ^{125}Jod bestimmen.

25 mg Natriummetabisulfit in 8 ml Puffer C lösen.

25 μl TSH (NIAMD) für die Markierung zur radioaktiven Substanz pipettieren und sofort 10 μl Chloramin T zugeben (Oxidation). Nach 10 sec 20 μl $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ zugeben und damit die Reaktion stoppen (Reduktion).

Inhalt des Spitzglases mit der Glaskapillare direkt auf das Gel bringen und Ausfluss der Säule öffnen.

50 μl KJ-Lösung in das Spitzglas geben und ebenfalls mit der Kapillare auf die Säule pipettieren.

Wenn Säulenoberfläche trocken, Säule langsam mit Puffer C füllen.

Jede Fraktion im Zählgerät zählen.

3.2.2.5. Berechnung der spezifischen Aktivität

Wir verstehen in diesem Fall unter der spezifischen Aktivität die an das Hormonprotein gebundene Radioaktivität in Ci/g Hormonprotein.

Von der anfänglich gemessenen Gesamtaktivität des Reaktionsgefäßes subtrahiert man die Restaktivität an der Pipette und die am Reaktionsgefäß und erhält so die Aktivität, die auf die Säule gebracht wurde. Dann ermittelt man die Zählrate für alle 30 Proben des Eluats. Die graphische Darstellung des Eluats zeigt Abbildung 3.

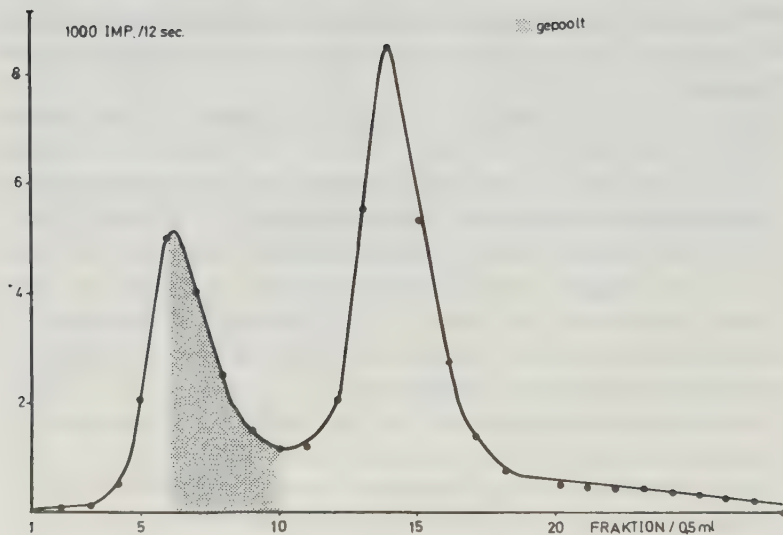


Abb. 3: Graphische Darstellung der Markierung:

Gepooit wurden F. 6 - 10.

Der erste Peak, der sogenannte Proteinpeak, enthält das markierte Hormon, in unserem Fall das ^{125}I -Jod-TSH. Im zweiten radioaktiven Peak, dem sogenannten Salzpeak, ist vor allem ^{125}I -Jodid.

Die Berechnung der spezifischen Aktivität soll am Beispiel einer Markierung gezeigt werden:

Markierte Menge:	2,5 µg TSH in 5 µl Puffer C
Markierungsdauer:	7 sec
Eingesetzte Aktivität:	0,5 mCi/2,5 µg TSH in 20 µl Puffer D
Gesamtaktivität:	25660 C/O,5 min (gezählt mit dem Geigerzählrohr im Reaktionsgefäß)
Restaktivität:	2233 C/O,5 min (gezählt mit dem Geigerzählrohr im Mischgefäß)
Differenz zwischen Gesamt- und Restaktivität wurde auf die Säule gebracht:	90 % = 2,2 µg TSH und 0,45 mCi ¹²⁵ J
Auf der Säule: Gesamt-counts (25 Fraktionen):	52139 C/O,5 min (gezählt mit dem Geigerzählrohr)
TSH-Peak (6 Fraktionen):	13702 C/O,5 min = 39,2 % der Gesamtaktivität (gezählt mit dem Geigerzählrohr)
Spezifische Aktivität des TSH:	78,4 Ci/g TSH

Als Tracer wurden Fraktion 6 - 10 (84,3 % des TSH-Peaks) verwendet und mit Puffer B auf 78 ml verdünnt. 100 µl des verdünnten Tracers haben 79000 C/min (gezählt im Gamma Guard). Der Tracer wurde auf 300 ml = 21000 C/min mit 0,6 ng TSH/100 µl weiter verdünnt und in dieser Gebrauchslösung bei 28° C eingefroren.

3.2.2.6. Zählgeräte

Zur Messung der γ -Strahlung des Jodisotops ¹²⁵Jod benützten wir zwei Bohrlochkristallszintillationszähler, das Geigerzählrohr der Fa. Telefunken und den Gamma Guard der Fa. Tracerlab. Dieses Gerät arbeitet nach folgendem Prinzip:

Die Probe wird in einen Natriumjodidkristall eingefahren. Die γ -Strahlung verursacht durch elektronische Anregung neben Schwingungen des Natriumjodidkristalls Freisetzung von Lichtquanten durch Fluoreszenz. Die Lichtquanten werden von

einem Fotomultiplier in elektrische Energie umgesetzt und verstärkt.

Eine wichtige Einstellgrösse ist die Zählzeit. Dabei ist auf das Ausmass des statistischen Zählfehlers zu achten, der definiert ist als:

$$F = \frac{\sqrt{N}}{N} \quad (\%) \quad (N = \text{Zahl der Impulse})$$

Die Zählrate wurde immer höher als 1000 Impulse gewählt, was einem statistischen Zählfehler von ca. 3,3 % entspricht.

3.3. RADIOIMMUNOASSAY

Unser Assay ist auf die 1962 von MORGAN und LAZAROW (27) entwickelte Doppelantikörpermethode zur selektiven Entfernung des bound Anteils aus dem Reaktionsgemisch aufgebaut. Dabei erfolgt die Trennung von bound und free durch Präzipitation von bound mittels eines γ -Globulin-Antiserums (2. Antikörper) (9).

3.3.1. TSH-Eich- und Wiederfindekurve

Der Kühltruhe TSH-Stammlösung mit 1000 μ E TSH/0,1 ml sowie 120 ml Puffer B und 120 ml TSH-armes Serum (hergestellt durch pooling von in Bezug auf TSH supprimierten Seren (negativer TRH-Test) entnehmen. 20 ml Erlenmeyerkolben mit der Verdünnungsreihe 100 - 0,39 beschriften und in den 1. Kolben (100) 0,2 ml TSH-Stammlösung + 19,8 ml Puffer B pipettieren. In jeden weiteren Kolben werden 10 ml Puffer B vorgelegt (1:2 Verdünnung). Es wird eine Verdünnungsreihe von 100 μ E TSH/ml ausgehend angefertigt. Die fertige Eichkurve wird in Portionen zu 0,8 ml eingefroren (bei -30° C). Die Wiederfindekurve wird analog der Eichkurve angefertigt, nur dass statt Puffer B TSH-armes Serum verwendet wird.

3.3.2. Kurzversuch zur Bindung des Tracers

Nach der Markierung wird die Bindungsfähigkeit des Tracers in einem Kurzversuch mindestens einen Tag vor Beginn eines Durchgangs geprüft.

Je 3 Proben zu 0,6 ml Ak-I-Lösung + 0,2 ml Puffer B + 0,1 ml Tracer und 3 Proben zu 0,6 ml Ak-I-Lösung ohne Ak-I + 0,2 ml Puffer B + 0,1 ml Tracer werden über Nacht (12 - 16 Std.) inkubiert und am nächsten Tag 3 Stunden mit Ak-II-Lösung präzipitiert.

Bei unseren Versuchen war zwischen 20 % und 35 % des Tracers in ca. 14 - 20 Std. gebunden.

3.3.3. Durchführung des Assays

Beschriften der Gefäße: Die Eppendorfgefäße müssen durchgehend für alle Proben beschriftet werden, um Verwechslungen zu vermeiden.

Tab. 1: Schema für die Beschriftung der Gefäße.

1. Eichkurve:	9 x B_0	2. Wiederfindekurve:	3 x W_0
	6 x N		3 x W_N
	3 x 0,39		3 x $W_{0,39}$
	3 x 0,78		3 x $W_{0,78}$
	3 x 1,56		3 x $W_{1,56}$
	3 x 3,1		3 x $W_{3,1}$
	3 x 6,2		3 x $W_{6,2}$
	3 x 12,5		3 x $W_{12,5}$
	3 x 25,0		3 x W_{25}
	3 x 50,0		3 x W_{50}
	3 x 100,0		3 x W_{100}
	3 x KN		3 x KM
			3 x KH

Der Standard-Leerwert (B_0) wird zur Bestimmung der unteren Nachweisgrenze in 9fach-Werten gemessen. Die untere Nachweis-

grenze wird aus der Streuung des Standardleerwertes berechnet. Die unspezifische Bindung wird in 6fach-Werten gemessen.

Für alle Proben werden ebenfalls je drei beschriftete Gefässe vorbereitet. Am Schluss des Assays laufen noch je drei Kontrollwerte mit.

Tab. 2: Pipettier- und Inkubationsschema.

	Probe µl	N µl	Leerwert µl
1. Tag			
Serum bzw. Standard	200	-	-
Puffer B	-	200	200
AK 1-Lösung mit Anti-TSH	600	-	600
AK 1-Lösung ohne Anti-TSH		600	

mit Dilutor zusammen pipettieren (gute Durchmischung) und etwa 44 Std. bei 18 - 25° C (Raumtemperatur) inkubieren. Verschluss der deckellosen Eppendorfgefässe während der Inkubationszeiten mit Selbstklebefolie.

3. Tag	
¹²⁵ J-TSH (Tracer)	überall 100 µl

mit Hamilton-Spritze zufügen (gute Durchmischung), anschliessend etwa 60 Std. bei Raumtemperatur inkubieren.

6. Tag	
AK 2-Lösung	überall 200 µl

mit Hamilton-Spritze zufügen, anschliessend 3 Std. bei Raumtemperatur inkubieren. Von etwa zehn Proben wird die Gesamtaktivität gemessen. Dann werden sämtliche Proben 5 min lang bei 2000 g zentrifugiert, die Überstände (automatisch) abgesaugt und die Rückstände 1 min im Gamma-Zählgerät gezählt.

3.3.4. Inkubationszeit, Temperatur und Titration der Antikörper

Der erste Antikörper war nach Angaben von NIAMD Bethesda titriert (Vorreinigung durch Abfangen der LH-Antikörper mit 10 I.E. hCG; etwa 40 % Bindung bei einer Verdünnung von 1 : 20 000 in 0,1 ml/Probe. Endverdünnung 1 : 220 000). Die Reaktionskinetik war schon von ERHARDT et al. (14, 15, 16) untersucht worden. Ebenso der Einfluss der spezifischen Aktivität des Tracers auf die Empfindlichkeit und Richtigkeit der TSH-Bestimmung (14, 22, 45). Unser Tracer war in seiner Gebrauchsverdünnung (spezifische Aktivität 20-70 mCi/mg; 0,2 - 1,5 ng/Probe = ca. 25000 CpM) drei Wochen verwendbar (14, 41).

3.3.5. Auftauversuch

Der Einfluss von wiederholtem Auftauen auf die TSH-Bestimmung im Radioimmunoassay: Da immer wieder Seren bestimmt werden mussten, die mehrmals aufgetaut und wieder eingefroren waren, schien es notwendig, den Einfluss von wiederholtem Auftauen auf die TSH-Werte zu untersuchen. Verglichen wurde der TSH-Spiegel eines Serums, das bereits einmal eingefroren war, mit Fraktionen desselben, die 2, 3, 4 und 5mal eingefroren waren. Die Proben wurden bei -80°C mit Hilfe von Trockeneis in Methanol schnell eingefroren und im Wasserbad bei 37° wieder aufgetaut. Es wurden 6 niedrige (0,43 - 4,3 μE TSH/ml), drei mittlere (7,3 - 15,5 μE TSH/ml) und zwei hohe (19,3 - 29,9 μE TSH/ml) in Doppelwerten bestimmt. Der VK lag bei niedrigen Werten zwischen 1,7 und 9,9 %, bei mittleren zwischen 10,5 und 11,9 % und bei hohen zwischen 5,0 und 12,4 % (siehe Tab. 3). Die Schwankungen lagen also innerhalb der Fehlergrenzen des TSH-RIA. Wiederholtes Auftauen hat somit keinen Einfluss auf die immunologische Aktivität des Serum-TSH.

Tab. 3: Auftauversuch.

		Proben mit niedrigen, mittleren und hohen TSH-Werten									
1mal eingefr.	0,89	0,8	0,47	7,1	21,13	9,36	12,44	3,44	3,97		
	1,02	0,76	0,52	7,52	20,39	10,54	14,16	3,31	4,12		
2mal eingefr.	0,72	0,68	0,47	7,52	19,26	9,75	37,73	3,39	3,90		
	0,78	0,64	0,55	7,33	18,95	9,32	38,10	3,56	4,39		
3mal eingefr.	0,89	0,53	0,43	8,75	20,05	8,72	32,38	3,28	4,33		
	0,82	0,47	0,44	9,43	19,47	7,83	29,94	3,38	3,50		
4mal eingefr.	0,80	0,49	0,73	9,06	21,03		28,64	4,20			
	0,76	0,44	0,44	9,77	19,57		28,79	4,01			
5mal eingefr.	0,54	0,48	0,29	9,22	20,59	7,69	29,49	15,47			
	0,92	0,50	0,50	9,37	22,27	9,00	29,36	14,36			
VK	18,2	21,7	21,4	11,9	5,0	10,5	12,4	7,6	9,9	16,2	
$\bar{x} \pm s$	0,79	0,58	0,48	8,49	20,27	9,63	31,8	14,3	3,7	3,4	
lin	$\pm 0,14$	$\pm 0,13$	$\pm 0,15$	$\pm 1,3$	± 1	± 1	$\pm 1,9$	$\pm 1,1$	$\pm 0,3$	$\pm 0,6$	

3.3.6. Hämolyse

Einfluss der Hämolyse auf den Assay: Die Hämolyse beeinflusst die Doppelantikörpermethode im TSH-Radioimmunoassay nicht. Um den Einfluss der Hämolyse auf den Assay zu erfassen, wurden je drei Seren mit niedrigen, mittleren und hohen TSH-Werten bestimmt. Es wurde je eine nicht hämolytische und eine stark hämolytische Probe bestimmt, d.h. nach Gewinnen eines einwandfreien Serums wurde das Restserum stark mit den Erythrozyten gerührt, um eine starke Hämolyse zu erzeugen.

Der VK lag bei niedrigen Werten zwischen 1 und 14,0 %
bei mittleren Werten zwischen 0,9 und 10,9 %
bei hohen Werten zwischen 0,3 und 12,4 %

(wobei niedrige Werte zwischen 2,0 und 4,3 μ E TSH lagen,
mittlere Werte zwischen 6,2 und 7,7 μ E TSH,
hohe Werte zwischen 19,0 und 40,0 μ E TSH).

Tab. 4: TSH-Bestimmung in hämolytischen und nicht hämolytischen Seren.

<u>Normale Werte</u>	<u>Hämolytische Werte</u>
<1,1	<1,1
<1,1	<1,1
4,3	4,4
<1,1	<1,1
<1,1	<1,1
7,4	6,8
7,6	7,7
6,2	7,4
>40,0	>40,0
22,0	19,0

3.3.7. Die Bestimmung von T_3 -absolut wurde nach BLÜMEL (4) durchgeführt, T_4 wurde mit der kompetitiven Proteinbindungsanalyse bestimmt (24).

3.4. QUALITÄTSKONTROLLE

3.4.1. Qualitätskontrolle durch Wiederfindekurven im Humanserum

Die häufigsten Fehlerquellen von Seiten der Standardkurve lagen darin, dass B_0 nicht konstant war, ein oder zwei Kurvenpunkte aus der Reihe fielen oder im unteren Messbereich ein sogenannter "Hook-Effekt" auftrat (höhere Bindung als B_0). Ausserdem liefert die Standardkurve im nichtlinearen Bereich (über 25 μ E TSH) bis zu 30 % zu hohe Werte (17). Um dies zu kontrollieren, liessen wir in jedem Durchgang eine in TSH-armem Serum verdünnte Eichkurve, unsere Wiederfindekurve, mitlaufen. Um die relative Richtigkeit zu erhöhen, berechneten wir bei jedem Durchgang im linearen Bereich (linear innerhalb der logit-Darstellung) den linearen Regressionskoeffizienten, bei dessen Berücksichtigung auch der Between-Assay VK um mehr als die Hälfte sank (14).

3.4.2. Präzision (Streubreite)

Die zufälligen Fehler lassen sich nur erfassen, wenn man die Messung der gleichen Grösse oder die Analyse der gleichen Probe mehrfach durchgeführt hat. Je grösser der zufällige Fehler, desto mehr streuen die Einzelergebnisse und desto kleiner ist die Präzision des Assays. Die quantitative Angabe der zufälligen Fehler ist mit den definierten statistischen Maßzahlen Mittelwert und Standardabweichung oder den Variationskoeffizienten (VK) möglich. Die Präzision in der Serie (Within-VK), die man durch mehrfache Analyse der gleichen Probe in einer Untersuchungsserie ermittelt, ist meist

wesentlich besser als die Präzision zwischen den verschiedenen Durchgängen (Between-Assay-VK), die man durch mehrfache Analyse der gleichen unveränderten Probe in verschiedenen Durchgängen ermittelt (7).

3.4.2.1. Kontrollwerte

Am Anfang und am Schluss einer langen Versuchsreihe wurden Kontrollseren mit etwa 2,0 μ E TSH (niedrige Kontrolle: KN) 20,0 μ E TSH (mittlere Kontrolle: KM) und 50,0 μ E TSH (hohe Kontrolle: KH) mitbestimmt, um Differenzen zwischen Anfang und Ende des Assay zu messen und den Between-Assay-VK zu bestimmen. Wegen der langen Pipettierzeiten (bis zu drei Stunden) ergaben sich Differenzen in den Vorinkubationszeiten. Der Within-Assay-VK und der Between-Assay-VK wurden mit Hilfe der Wiederfindekurve korrigiert (siehe 3.4.1., Qualitätskontrolle).

Tab. 5: Der Within-Assay-VK.

Kontrolle	Anzahl der Werte	B/B ₀ (%)	μ E TSH	VK
KN	6	$\bar{x}$ 86,88 %	1,03 $\pm$ 0,04	5,2 %
KM	6	$\bar{x}$ 31,0 %	20 $\pm$ 1,0	7,0 %
KH	6	$\bar{x}$ 15,0 %	50 $\pm$ 12	33,9 %

3.4.3. Sensitivität

Unter der Sensitivität der Methode verstehen wir die untere Nachweisgrenze, die sich aus der Streuung der B₀-Werte errechnet.

Tab. 6: Kontrollwerte sämtlicher Durchgänge.

Durchgang	KN am Beginn	KN am Schluss	KM am Beginn	KM am Schluss	KH am Beginn	KH am Schluss
D II	2,5	-	15,0	-	25,0	-
D III	3,5	3,4	15,1	14,9	30,6	31,0
D IV	2,4	-	12,0	16,0	30,0	40,0
D V	1,0	1,1	21,5	19,5	45,0	60,0
D VI	2,3	1,5	19,8	11,6	-	49,4
D 43	4,8	4,0	18,5	18,0	42,0	45,0
D 46	2,9	2,7			38,3	39,5
D 74	2,8	2,8			41,8	46,2
D 75	2,8	2,7			39,0	40,4
D 78	1,4	1,4			39,5	38,5
Between-Assay						
VK	39,7 %	41,8 %	15,2 %	23,1 %	16,2 %	22,1 %
$\bar{x} + s$ lin.	2,6 ± 1	2,5 ± 1	17,6 ± 2,7	15,2 ± 3,5	37,9 ± 6,1	41,7 ± 9,2

3.4.4. Verdünnungseffekt

Unspezifische Einflüsse von Serumproteinen sind beschrieben (37, 40). Deshalb ist es wichtig, den Proteingehalt der Standard- und Serumproben so anzugleichen, dass eine gewisse Variationsbreite des Serumproteingehaltes (erzeugt z.B. durch Verdünnung) toleriert werden kann. Wir bestimmten Verdünnungskurven von Normalseren, die mit Puffer B je 2:3 bis 1:10 verdünnt worden sind.

Ergebnis: Im Rahmen der vorliegenden Proteinkonzentrationen lagen alle Abweichungen im Rahmen der Fehlergrenze (siehe auch 4.1.4.).

3.5. CHROMATOGRAPHIE VON MENSCHLICHEN HYPOPHYSENHORMONEN

3.5.1. Freisetzen der Hormone

Die Hypophysen werden zuerst in einem Mörser bei -180°C (Kühlung mit flüssigem Stickstoff) zerstossen, das Zerstoßene 4 Stunden bei 4°C mit Phosphatpuffer (Puffer C) gerührt und die Zellrückstände bei 3000 g abzentrifugiert. Die Hypophysen stammten von Leichen aus der Pathologie, waren 12 - 24 Stunden nach Eintritt des Todes entnommen und tiefgefroren worden.

3.5.2. Chromatographie des Überstands homogenisierter Hypophysen

3.5.2.1. Elutionsmedium

Um nach der Chromatographie die Gesamtproteinkonzentration bestimmen zu können, wählten wir als Elutionsmedium den proteinfreien Puffer C, den wir wegen der langen Elutionszeit (1 KAV = 124,4 Std.) mit 0,02 % Natriumacid als Bakterizid versetzten. Eluiert wurde im Kühlraum bei 4°C .

3.5.2.2. Vorbereitung der Sephadex G-100 Säule

Desaktivieren (= "Coaten") der Säule: 20 ml Puffer B werden vorsichtig auf das Gel pipettiert. Wenn der Puffer gerade eingesickert ist, werden vorsichtig 10 ml Elutionsmedium auf die Säule gegeben. Wenn diese 10 ml ebenfalls eingesickert sind, wird die Säule vorsichtig, ohne Gel aufzuwirbeln, aufgefüllt und mit dem Elutionsmedium verbunden (in unserem Fall mehrere Liter Puffer C mit 0,2 % Natriumacid). Es wird so lange mit Puffer C eluiert, bis im Eluat bei 280 nm kein Protein mehr nachweisbar ist (etwa 2 Liter).

3.5.2.3. Der KAV-Wert

3 ml Dextran-blue werden nun in der beim "Coaten" beschriebenen Weise auf die Säule gebracht und der Dextran-Peak bei 600 nm im Photometer gemessen. Der Dextran-blue-Peak bezeichnet das Totraumvolumen (= void volume) : In unserem Fall 190 ml = KAV 0,0. Nachdem das Dextran eluiert ist, ist die Säule betriebsbereit.

Der KAV wird berechnet:

$$KAV = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o} , \text{ wobei } V_o \text{ das Totraumvolumen, } V_e \text{ das aktuelle Volumen und } V_t \text{ das Totalvolumen (=Salzpeak) sind.}$$

3.5.2.4. Im Eluat gemessene Substanzen: Gesamtprotein, TSH, LH, Prl, GH und ACTH

Gesamtprotein im Photometer bei 280 nm mit UV-Licht;

Gesamtprotein nach LOWRY im Photometer bei 600 nm;

¹²⁵Jod im Gamma Guard (Salzpeak);

TSH mit der Doppelantikörpermethode (60);

LH mit der Doppelantikörpermethode (59);

Prl mit der Doppelantikörpermethode (55);

GH mit der Doppelantikörpermethode (20, 62);

ACTH durch Adsorption des freien Antigens an Talkum (61, 63);

Gesamtprotein wurde bei 280 nm unverdünnt oder in der Verdünnung 1:20 gemessen. Alle Hormonkonzentrationen wurden in Zehnerpotenzen verdünnt gemessen (1:10, 1:100, 1:1 000, 1:10 000, 1:100 000). Nur GH musste noch in der Verdünnung 1:5 000, 1:50 000, 1:200 000 nachbestimmt werden. Die Auffangzeit betrug 1 KAV = 124,4 Std. Das Auffangvolumen betrug 138 x 5 ml, d.s. 690 ml.

LH, GH und Prl wurden im Labor von WERDER radioimmunologisch bestimmt. ACTH wurde von ERHARDT mit Anti-Schweine-ACTH-Antikörper von Meerschweinchen (Dr.FEHM, Ulm, Charge MS 7) nach der Methode von YALOW und BERSON (63) bestimmt.

3.5.3. Messung von Gesamtprotein im Elutionsprofil

Gesamtprotein wurde von allen Proben im Zeiss-Photometer gegen einen Proteinstandard bei 280 nm bestimmt. Die Fraktionen, bei denen die Extinktion höher als 1,5 (0,67 Ext. E = 1 mg Protein/ml Schichtdicke der Küvette 1 cm) war, wurden 1:20 mit Elutionspuffer verdünnt. Bei einigen Proben wurde die Proteinbestimmung zur Kontrolle mit der Methode nach LOWRY wiederholt:

Reagenzien: A : Na_2CO_3 2 mg/100 ml 0,1 n NaOH
 B : CuSO_4 5 H_2O 0,5 g/100 ml H_2O
 C : 50 ml A + 1 ml B
 D : Folinreagenz 1:1 mit H_2O

Methode : 1.: 0,2 ml Probe + 1,0 ml C (10 min schütteln)
 2.: +0,1 ml Folin 1:1 (30 min schütteln)
 3.: Im Photometer bei 600 nm Extinktion messen.

Standards : Bilden eine Verdünnungsreihe von 1 mg/ml Albumin ausgehend: 1 mg; 0,5 : 0,25; 0,125; 0,0623 mg.

Die Ergebnisse beider Messmethoden waren innerhalb der Fehlergrenzen identisch, so dass bei späteren Messungen auf die Methode nach LOWRY verzichtet werden konnte. Ein mg Albumin entsprach einer Extinktion von 1,165 bei 280 nm, 1,133 Extinktionseinheiten bei 600 nm (LOWRY), dementsprechend

1 Extinktionseinheit = 0,67 mg Gesamtprotein/ml. Der Dextran-blue-Peak wurde im gleichen Photometer bei 600 nm gemessen und, wenn nötig, 1:20 verdünnt.

4. ERGEBNISSE

4.1. UNTERSUCHUNGEN ZUR IMMUNOREAKTIVITÄT VON TSH

4.1.1. Standardpräparationen

Ein wesentliches Kriterium für die Brauchbarkeit eines radioimmunologischen Tests muss die Unabhängigkeit von den jeweiligen Verdünnungen des Serums sein, auf das die Hormonkonzentrationen untersucht werden sollen, d.h. verschiedene Verdünnungen müssen nach der Multiplikation mit dem jeweiligen Verdünnungsfaktor dieselbe Endkonzentration enthalten. Diese kann nur durch die Korrektur der Proteinverhältnisse in der Eichkurve erreicht werden. Die Verdünnungen der Eichkurve wurden deshalb mit Puffer B, der eine dem Serum ähnliche Proteinkonzentration besitzt, ausgeführt. Da die oben genannte Bedingung erfüllt war, mussten TSH-Präparationen bei ihren Verdünnungen einen mit der Test-Standard-Kurve identischen Kurvenzug ergeben.

Untersucht wurden: NIH-TSH verdünnt in Puffer A
NIH-TSH verdünnt in supprimiertem Serum.

4.1.1.1. NIH-TSH

Gibt man für jede gemessene Verdünnung das Produkt aus Serumverdünnungsfaktor und Serumkonzentration an, so zeigt es sich, wie aus Tabelle 7 zu entnehmen ist, dass der Fehler kleiner als 10 %, also im Rahmen der Fehlerbreite der Methode war.

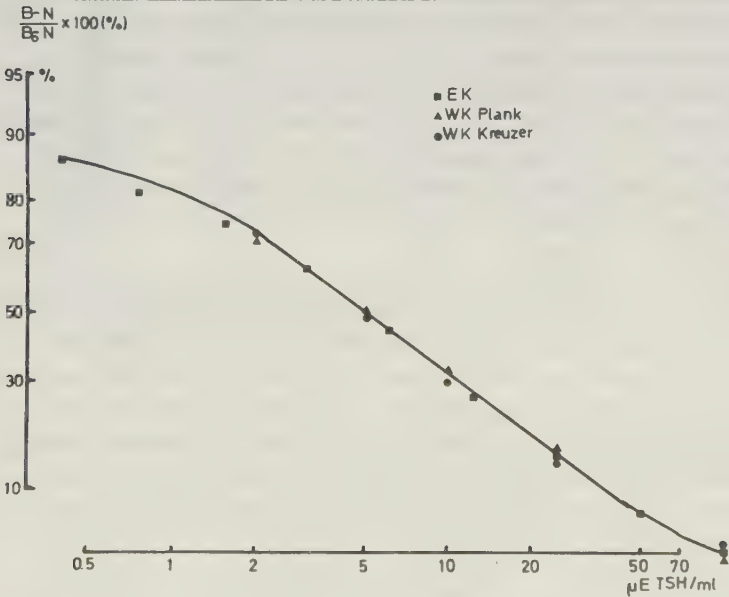
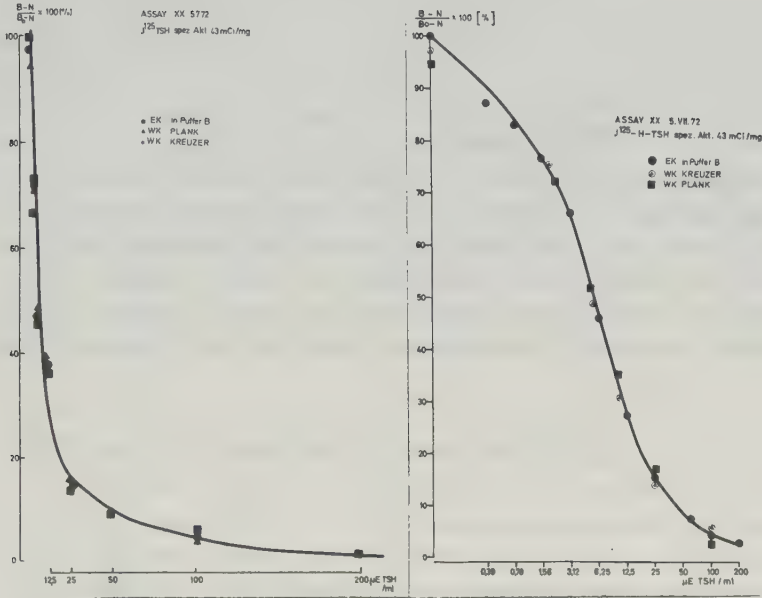
Tab. 7: Immunoreaktivität von NIH-TSH.

Verdünnungen von NIH-TSH in supprimiertem Serum

1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256
<u>Abgelesen auf der Standardkurve:</u> $\bar{x} \pm s = 48,6 \pm 0,028$; VK = 5,7 %.							
48,0	50,0	54,0	47,0	46,4	45,0	48,1	50,2

Als weiteres Indiz für die gleiche Immunoreaktivität benutzen wir die graphische Darstellung der Standardkurve in folgender Weise:

Als Bezugspunkt aller Verdünnungen wurde der unverdünnte Wert ausgewählt. Daraus wurde die zu erwartende TSH-Konzentration für jede einzelne Verdünnung berechnet. Diese TSH-Konzentration wurde nun als Abszissenwert für den zugehörigen B/B_0 -Wert eingetragen und der sich aus der Verbindung der Messpunkte ergebende Kurvenzug mit der Standardkurve verglichen. Vereinbarungsgemäss liegt der Bezugspunkt immer auf der Standardkurve; die übrigen Verdünnungspunkte nur dann, wenn die gleiche Immunoreaktivität vorliegt.



bb.4: Die von uns verwendete TSH-Standardpräparation und deren Wiederfindekurve in den unter 3.2.1. beschriebenen graphischen Darstellungsmöglichkeiten. Für die Wiederfindekurve wurde das Serum von 2 Patienten (Plank, Kreuzer) verwendet, deren TSH-Spiegel durch Gaben von 100 μg T_3 supprimiert waren. 4a) = Abszisse und Ordinate linear. 4b) = Abszisse logarithmisch, Ordinate linear. 4c) = Abszisse logarithmisch, Ordinate "logit".

4.1.2. TRH-Infusionen

Allen Patienten wurde aus der Vena cubitalis mit einer Braunüle oder einer Kanüle Nr. 1 Blut abgenommen. Anschliessend wurde 200 µg TRH durch die selbe Kanüle schnell injiziert und sofort die Infusion (800 µg TRH/500 ml 0,9 % NaCl) angelegt. Der Infusomat wurde auf 120 ml/Std. eingestellt, um eine konstante Infusionsdauer über 240 min zu gewährleisten.

4.1.2.1. TSH-Antwort auf Stimulation mit 1000 µg TRH

Das Ergebnis deckt sich mit der Literatur (25, 46, 57) : Nach etwa 90 min steigen die TSH-Werte nicht mehr an, da die Hypophyse durch den endogenen T_3 -, T_4 -, TSH-, TRH-Rückkopplungsmechanismus endogen an der Ausscheidung grösserer TSH-Mengen möglicherweise gehemmt wird (5). Ausserdem wird TRH im menschlichen Serum (37° C) in 15 min deaktiviert (5). Es wurde der 0'-, 30'-, 90'-, 120'-, 180'- und 240'-Wert bestimmt. 20 min später wurde noch der Abfall des TSH gemessen (260'-Wert). Ein geringer "Off-Effekt" (TSH-Anstieg nach Ende der TRH-Infusion) konnte in zwei Fällen, jedoch nicht regelmässig, beobachtet werden.

4.1.2.2. T_3 - und T_4 -Werte bei Infusion von 1000 µg TRH

Ein direkter Zusammenhang des TSH-Anstiegs zu T_4 -Werten liess sich bei Ausschluss von Patienten unter Antioyulantien und blander Struma nicht ermitteln. Dies deckt sich mit der Literatur (35, 47, 57). Im Hinblick auf die kompensatorische T_3 -Mehrsekretion kann eine T_4 -Mehrsekretion nicht erwartet werden (11, 27). Wir fanden ebenfalls einen Anstieg der T_3 -Sekretion.

ug T_4 /100 ml
ng T_3 / 10 ml
ug TSH/ml

Infusion von 1000 μ g TRH in 240 min bei 11 Patienten

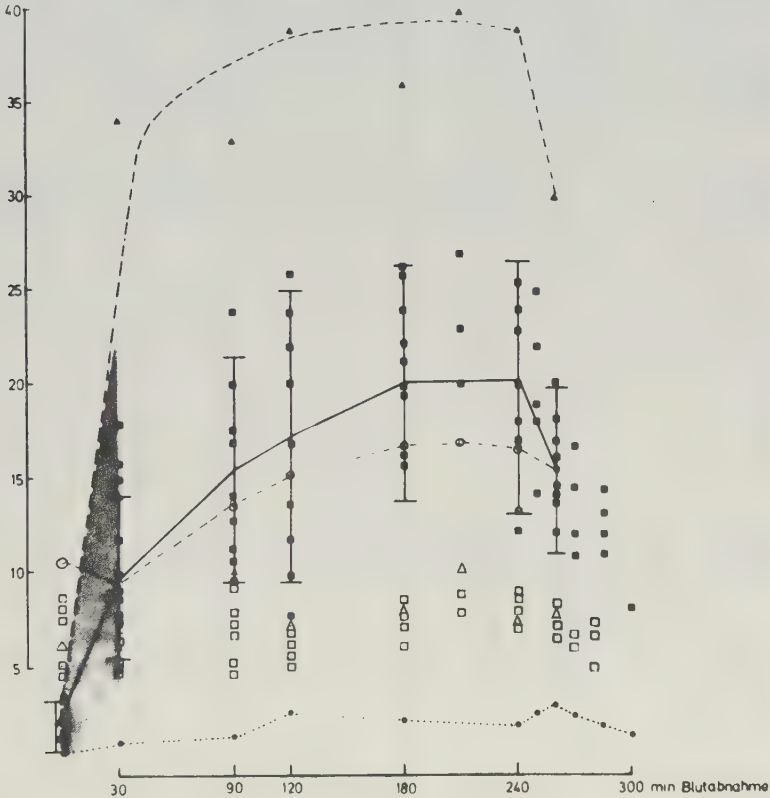


Abb. 5: TSH-, T_3 - und T_4 -Antwort auf Stimulation mit 1000 μ g TRH.

- — TSH normal stimulierbar (N=9)
- ▲ - - - TSH stark stimulierbar (N=1)
- TSH nicht stimulierbar (N=1)
- T_4 $\bar{x} \pm s$ (lin) absolut (N=9)
- △ T_4 $\bar{x} \pm s$ (lin) absolut zu TSH stark stimulierbar
- - . - . - T_3 absolut (N=1)
- ▨ TSH Normalbereich nach ERHARDT et al. (14)

Tab. 8: TSH-, T₃- und T₄-Werte nach Infusion mit 1000 µg TRH.

	Pat.	0'	30'	90'	120'	180'	210'	240'	260'	280'	300'
TSH	1	1,5	8,8	17,5	20,0	20,0		18,0	16,0	11,0	9,6
T ₄		4,6	4,5	4,5	4,9			6,6	6,2	7,1	4,9
T ₃											
TSH	2	0,3	16,0	23,0	24,1	24,0		28,0	23,0		
T ₄											
T ₃											
TSH	3	3,0	10,0	24,0	26,1	24,0		24,0	18,8	12,0	
T ₄		4,9		5,1		5,9		6,2	6,6		
T ₃											
TSH	4	1,2	16,4	19,0	21,5	22,0		19,8	12,1		
T ₄		7,2	6,3	7,4					6,4		
T ₃											
TSH	5	2,4	7,1	10,6	11,7	15,5	16,0	13,1	13,8		
T ₄		8,1		8,2		8,5	7,1	8,7	7,0		
T ₃											
TSH	6	1,5	4,6	9,5	7,6						
T ₄											
T ₃											
TSH	7	2,0	11,8	17,0	26,0	26,0		34,0	13,2		
T ₄		4,7	5,2	6,4	6,0	7,5		7,0	7,1		
T ₃											
TSH	8	2,1	5,2	10,0	9,0	8,0		16,2			
T ₄		4,9	4,9	7,0	7,3	8,0		8,9			
T ₃											
TSH	9	0,2	6,4	8,3	8,5		8,8	8,0	10,3		
T ₄		7,9	6,8	6,8	6,2		7,9	7,8	8,3		
T ₃		107,3	95,1	138,4	158,6		170,0	166,0	155,5		

TSH	10	3,3	34,2	33,0	39,0	36,0	40,0	39,0	30,0	
T ₄		6,3	5,8	9,5	6,7	7,1	8,1	7,0	6,0	
T ₃										
TSH	11	0,45	0,9	1,2	2,5	2,0		1,8	3,0	1,1
T ₄		6,4			6,5	6,6		7,1	7,0	6,6
T ₃										
TSH: VK	57,6%	45,7%	38,9%	45,8%	32,3%			41,3%	28,4%	
$\bar{x} \pm s$	1,7 +1,0	9,6 +4,4	15,4 +6,0	17,2 +7,8	20,2 +6,5			20,1 +8,3	15,3 +4,4	
T ₄ : VK	22,9%	15,6%	27,3%	12,8%	12,9%			13,0%	10,5%	
$\bar{x} \pm s$	6,1 +1,4	5,8 +0,7	7,2 +1,3	6,5 +0,5	7,2 +0,9			7,4 +1,0	6,8 +0,7	

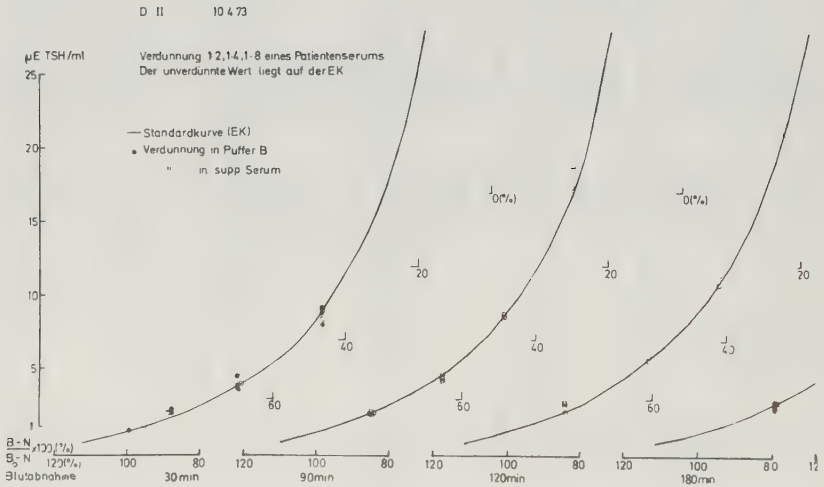
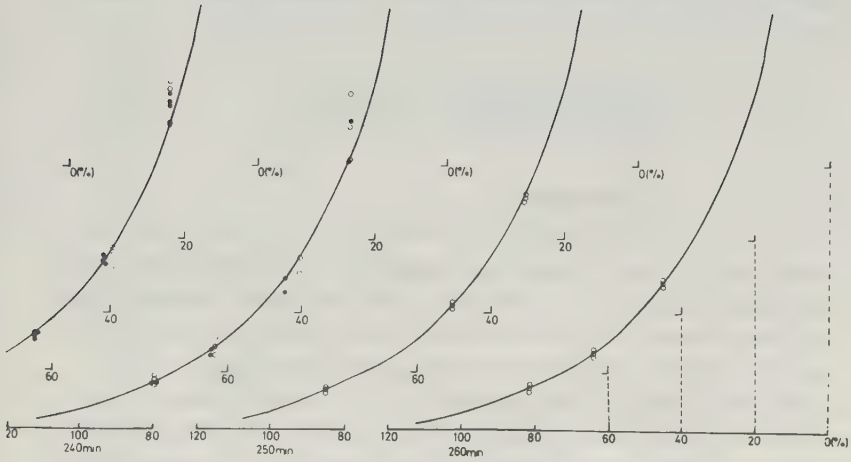


Abb. 6: Verdünnungskurven eines Patientenserums zu verschiedenen Zeiten der Blutabnahme vor, während und nach TRH-Infusion.



Es wurden die Standardkurve (—), in Puffer B verdünnte Werte (●) und Werte, die in supprimiertem Serum verdünnt waren (○), miteinander verglichen. Ergebnis: In supprimiertem Serum verdünnte Werte verhalten sich wie die in Puffer B verdünnten im Bereich 1 - 25 μ E TSH.

4.1.3. Verdünnungsreihen von peripherem TSH
(Patientenserum) in Puffer B und suppri-
miertem (= TSH-O-Serum) Serum nach Stimu-
lation mit TRH

Wie schon in 3.4.1. beschrieben, treten Differenzen zwischen Standard und Wiederfindekurve auf. Deshalb wurden parallel zu den in Puffer B verdünnten Seren Verdünnungen in suppriertem Serum gemacht.

4.1.4. Verdünnungskurven des Serums
von Normalpersonen

4.1.4.1. Mittelwerte

Da bei den Verdünnungsreihen mehrere Abweichungen gefunden wurden und mehrere Durchgänge hohe Regressionskoeffizienten aufwiesen, musste ein eindeutiger Weg gefunden werden, die teilweise recht unterschiedlichen Ergebnisse zu vergleichen und fehlerhafte Werte auszuschliessen. Dazu wurden alle Eich- und Wiederfindekurven sowie alle Verdünnungsreihen logit-transformiert. Es wurden nur Kurven verwendet, bei denen die Winkel der Eichkurve und Wiederfindekurve um nicht mehr als 2° im Bereich 2 - 25 μ E TSH bei der Logit-Darstellung voneinander abwichen. Ferner wurden nur Durchgänge verwendet, deren Standard und Wiederfindekurve einen Winkel von $139,5^{\circ} \pm 2^{\circ}$ bildeten. Diese Voraussetzungen ergeben die gemittelte Eichkurve für die Durchgänge D II, D III, D VI, D 78. Tab. 9 zeigt die charakteristischen Messwerte für alle Durchgänge. Abb. 7 zeigt die gemittelte Eichkurve.

Tab. 9: Mittelwerte - Charakteristische Messwerte für alle Durchgänge.

Für die Auswertung der Verdünnungskurven wurden nur die Durchgänge D II, D III, D VI und D 78 verwendet.

Durchgang	Vor- inkub.	Inkub.	untere Nach- weisgrenze	spezif. Aktivität	Gesamt- aktivität	% Bindg.	unspezif. Bindg.	mit d. Abszisse EK WK
D I	92	Std. 60	2,0 μ E TSH	61,5 mCi	11 053 CpM	53	858 CpM	155° 141°
D II	41	71,5	0,5	49,5	25 734	45,7	350	141,5° 139°
D III	70	103,0	2,0	49,0	26 400	41,0	590	140,5° 139°
D IV	173	70,0	2,0	54,5	26 300	64,0	650	141,5°
D V	48	64,0	3,0	54	19 001	34,0	634	146° 130-154°
D VI	47	64,0	1,0	124,8	30 200	38,0	703	139° 141°
D 43	48	51,5	0,58	59,0	22 369	55,5	546	138,5°
D 46	53	64,0	0,8	50,0	25 540	46,0	403	136°
D 74	40	47,5	1,1	53,0	17 400	58,0	450	130° 131°
D 75	48	64,0	0,7	71,6	24 800	64,0	500	133° 133°
D 78	48	64,0	0,6	58,0	21 100	39,0	300	140° 137,5°

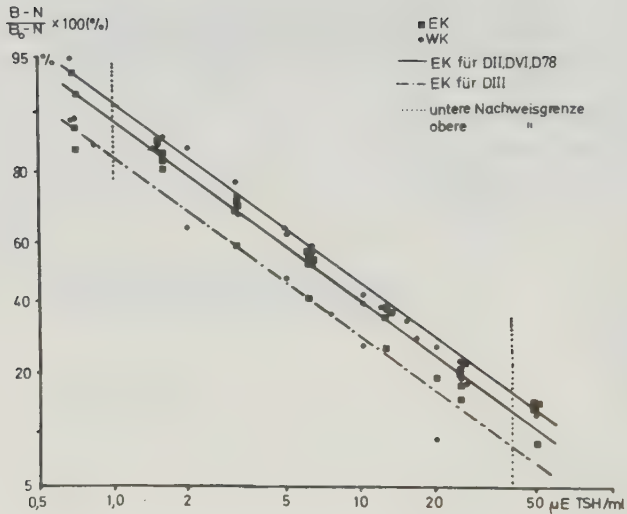


Abb. 7: Gemittelte Eichkurve für D II, D III, D VI und D 78. D III hatte eine längere Vor- (70 Std.) und eine längere Inkubationszeit (124 Std.) und entsprechend eine um 10 % höhere Bindung, was besonders im nicht-linearen Bereich nur relativ richtige TSH-Werte ergibt.

Werte der gemittelten Eichkurve:

Vorinkubation: 41 - 48 Std.
 Inkubation mit Tracer: 64 - 71,5 Std.
 Spezif. Aktivität: 48 - 124,8 mCi
 Gesamtaktivität: 200 - 1000 pg/Probe =
 21 100 - 30 200 Cpm
 Unspezifische Bindung: 300 - 700 Cpm
 % Bindung: 38 % - 45,7 %
 50 % Intercept: 6,5 - 7,5 µE TSH
 Kontrollen: KN : 2,6 ± 1,0 µE TSH
 KM : -
 KH : 40,0 ± 9,0 µE TSH

Untere Nachweisgrenze: 1,0 µE TSH

Abweichung des Regressionskoeffizienten: 0,1 für die entsprechenden Einzelwerte der Standard- bzw. Wiederfindungskurve.

4.1.4.2. Einzelwerte

Bei insgesamt 9 Normalpersonen, d.h. Personen mit normaler Stimulierbarkeit und normalem TSH-Basalwert nach ERHARDT et al. (14), einer stark stimulierbaren und einer nur im untersten Bereich stimulierbaren Person wurden TRH-Stimulationen mit 1000 µg TRH durchgeführt. Verdünnt wurden der 30'-, 90'-, 120'-, 180'-, 210'-, 240'- und der 260'-Wert. Innerhalb der ausgewerteten Durchgänge (siehe Mittelwerte) wich keine Verdünnungskurve um mehr als 3° von ihrer Eichkurve ab. Insgesamt bildeten alle Verdünnungskurven Winkel zwischen 136° - 143° mit der Abszisse. Die Mittelwerte für die einzelnen Abnahmezeiten zeigt Tab. 9.

Tab.10: Mittelwerte für die einzelnen Abnahmezeiten.

Der Mittelwert für die Winkel des	(N) Anzahl der Werte
30'-Wertes war 138,9°	11
90'-Wertes war 139,0°	8
120'-Wertes war 139,3°	12
180'-Wertes war 139,9°	14
240'-Wertes war 139,6°	10
260'-Wertes war 138,8°	10
der Fraktionen 140,5°	4
aller Serumwerte 138,9°	26
aller Pentex- werte 139,55°	42
VK 1,3 %	69

Das arithmetische Mittel für alle Kurven war 139,362°. Es unterscheidet sich damit nur wenig von der gemittelten Eichkurve. TSH wird im Serum etwas stärker (in unserem Fall um 0,72 %) gebunden, als in Puffer B, was aus der Literatur bekannt ist (9, 15). Aus den übrigen Mittelwerten können keine Folgerungen gezogen werden, da die Winkel bei mehrfach verdünnt bestimmten

Werten fast über die ganze Fehlerbreite schwankten. Die Werte schwankten innerhalb der Eichkurve des jeweiligen Durchgangs um 3,3 % und die Eichkurven untereinander um 4,4 %, insgesamt schwankten die Werte jedoch nur um 7,7 %, was einem VK von 1,3 % entspricht (siehe Abb. 8).

$\frac{B}{B_0} \cdot \frac{N}{N_0} \times 100 (\%)$

D VI

5.11.73

TSH Verdünnungskurven TRH-stimulierter Patienten

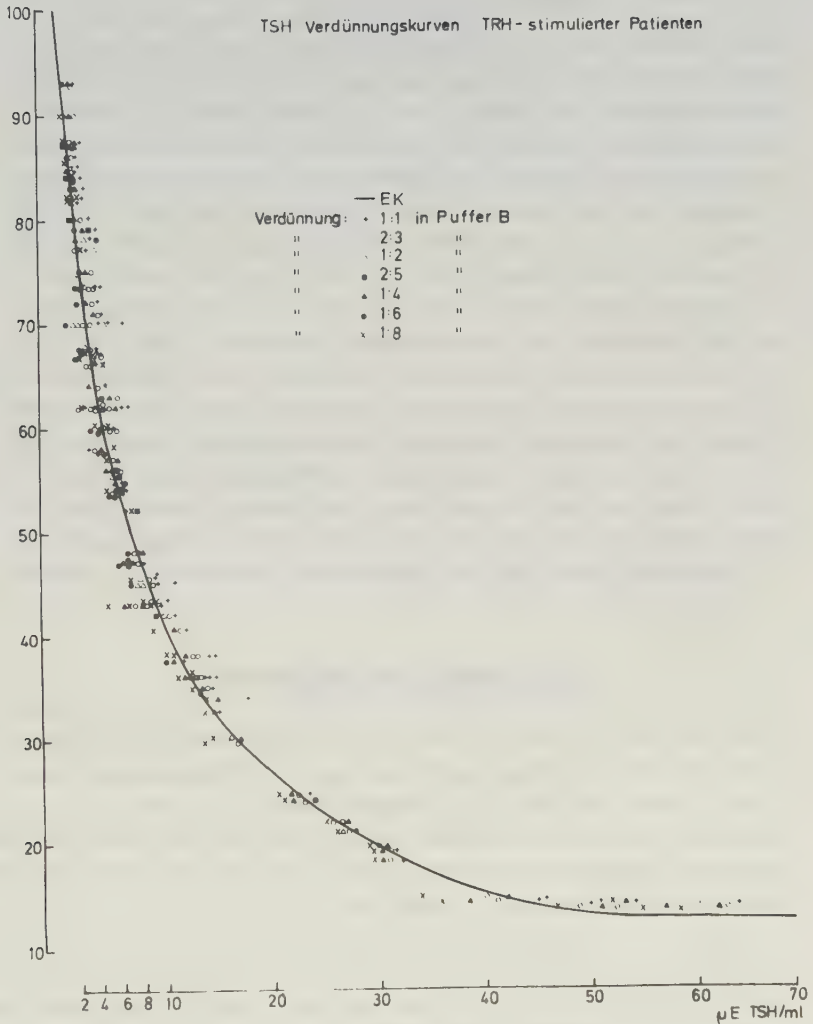


Abb. 8: Absolute und relative TSH-Serumwerte eines Durchgangs.
 Es wurden nur Werte verwendet, die auch den Kriterien für Mittelwerte genügten.

4.1.4.3. Richtigkeitskontrolle der TSH-Verdünnungskurven

Nach Prüfung der Dreifachwerte war es durch Eintragen in das Logit-System möglich, festzustellen, ob die verdünnten Werte unserer Qualitätskontrolle entsprachen. Es wurden alle Meßwerte und sämtliche ausmultiplizierten Werte logit-transformiert. Lagen alle Werte einer Verdünnung auf einer Geraden, so war korrekt verdünnt worden. Dies war bei Durchgängen, die nicht den unter "Mittelwerte" aufgeführten Bedingungen entsprachen, nicht zu erwarten, so dass diese Durchgänge nicht berücksichtigt wurden. Alle Verdünnungskurven innerhalb der verwendeten Durchgänge, die mehr als 3° von der Eichkurve abwichen, konnten auf Grund unzureichender Dreifachwerte, Messung im unempfindlichen Bereich des Assay oder falscher Verdünnung wegen ausgeschlossen werden. Bei einigen Assays wichen alle Verdünnungskurven um 10 und mehr Grad von der Standardkurve ab. Doch bildeten diese Standardkurven Winkel von 133° oder 155° , wichen somit um 10 oder mehr Grad von der gemittelten Eichkurve ab (siehe Abb. 9a und 9b).

4.1.5. Verdünnungskurven des Serums hypothyreoter Patienten

Eine Patientin (Pat.10) erschien präklinisch hypothyreot (12, 17, 46). Der Basalwert lag im oberen Normbereich und der 30'-Wert war mit $34,2 \mu\text{E TSH}$ erhöht. Im Laufe der Infusion war sie allerdings bis $45,0 \mu\text{E TSH}$ stimulierbar und damit um etwa $25 \mu\text{E}$ über der Norm. TSH verhielt sich jedoch wie bei Normalpersonen (siehe Tab. 4).

4.1.6. Normalkollektiv

Unser Normalkollektiv bestand aus acht Männern und einer Frau. Alter: 31 - 74 Jahre, Durchschnittsalter 49,1 Jahre. Anamnese: Keine hirnnorganischen Schäden, keine Hinweise auf hypophysäre Erkrankungen oder Erkrankungen der Schilddrüse.

Diagnose: Gastrointestinale Störungen und Störungen im Bereich des hämatopoetischen Systems.

Durchschnittliches Übergewicht: 14,3 %.

Alle Patienten waren schilddrüsengesund.

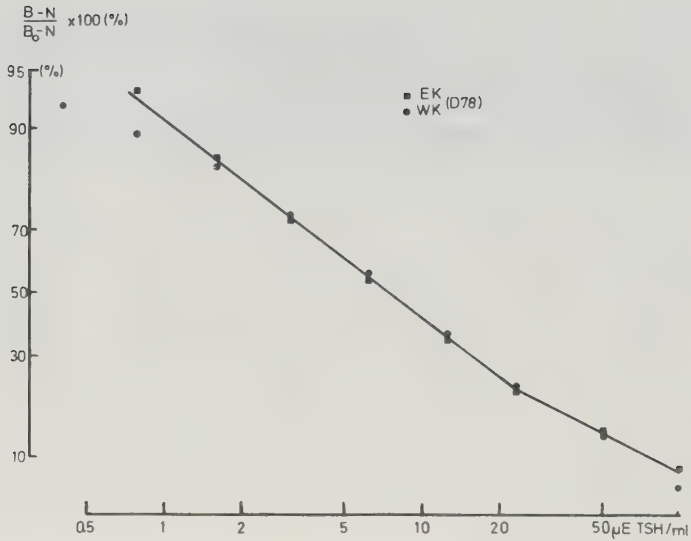


Abb. 9a: Eich- und Wiederfindekurve innerhalb der Bedingungen der gemittelten Eichkurve (D 78).

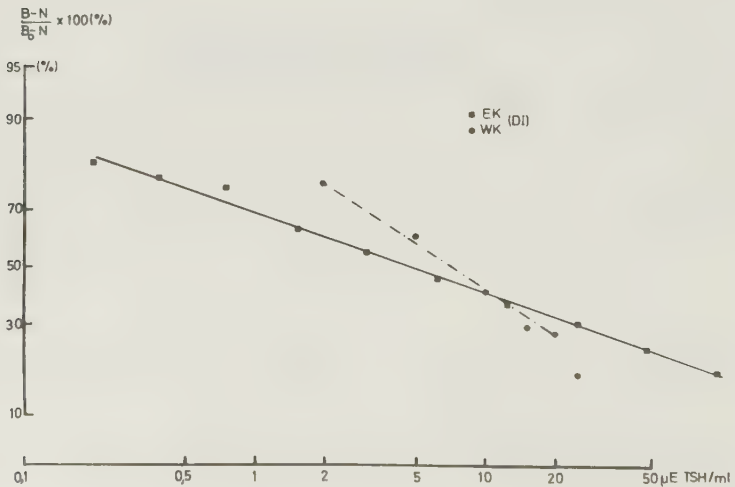


Abb. 9b: Sehr schlechte Eich- und Wiederfindekurve (D I): Kreuzung von EK und WK. D I wurde verworfen.

4.2. SÄULENCHROMATOGRAPHIE VON HYPOPHYSEN-
ÜBERSTÄNDEN NACH HOMOGENISIEREN UND
ZENTRIFUGATION

4.2.1. Das im Überstand vorhandene Protein eluiert hauptsächlich in drei Fraktionen: In der ersten Fraktion befindet sich "big" ACTH, "big" Prl und "big-big" GH, sowie alle gelösten grossmolekularen Strukturproteine. In der zweiten Fraktion befindet sich 96 % des TSH und 100 % des LH sowie "big" GH. In der dritten Fraktion finden wir den ACTH-, Prl- und GH-Peak.

4.2.1.1. Die Messung von Gesamtprotein brachte mit beiden Messmethoden identische Ergebnisse, so dass bei allen weiteren Versuchen auf die kompliziertere Methode (nach LOWRY) verzichtet werden konnte. Im ersten Peak fanden wir Moleküle mit einem Molekulargewicht grösser 60 000, was in etwa dem Molekulargewicht von Dextran-blue entspricht. Im zweiten Peak waren hauptsächlich Moleküle mit einem Molekulargewicht von 20 000 - 25 000; im dritten Peak Moleküle mit einem Molekulargewicht von 12 000 - 15 000. Der erste Peak lag bei KAV 0,186; der zweite bei KAV 0,3 und der dritte bei KAV 0,51. Der Salzpeak liegt definitionsgemäss bei KAV 1,0.

4.2.1.2. Der TSH-Peak fand sich fast ausschliesslich im zweiten Peak bei KAV 0,3. Im ersten Proteinpeak wurde bei KAV 0,013 ein "big" TSH-Peak von 4 % des Gesamt-TSH wiederholt gefunden. Es handelt sich wahrscheinlich um noch an Strukturprotein gebundenes TSH oder um damaged Tracer, der mit "falschen Antikörpern" reagiert hat. Wir bestimmten 0,43 I.E. TSH / Hypophyse, was den Angaben der Literatur entspricht (43).

4.2.1.3. LH konnte nur im zweiten Proteinpeak gefunden werden. Es wird annähernd gleichzeitig mit TSH bei KAV 0,308 eluiert. Es wurden 0,57 mg LH / Hypophyse bestimmt, was den Angaben der Literatur entspricht (50).

4.2.1.4. ACTH: "Big" ACTH fand sich im ersten Proteinpeak bei KAV 0,106. ACTH wird im dritten Proteinpeak bei KAV 0,508 eluiert. Es erschien trotz niedrigerem Molekulargewicht vor GH (KAV 0,56), wahrscheinlich, weil wir bei unserem präparativen Ansatz mit zu hohen Proteinkonzentrationen gearbeitet haben. Es wurden 29,5 mg ACTH / 10 Hypophysen bestimmt, was sich mit den Angaben der Literatur deckt (33, 42).

4.2.1.5. GH wurde in allen drei Proteinpeaks gefunden, "big-big" GH bei KAV 0,052 und 0,16, "big" GH bei KAV 0,34 und GH bei KAV 0,56. Die Konzentration der drei immunoreaktiven Fraktionen variiert von Hypophyse zu Hypophyse kaum (62). wir massen 3,5 mg GH / Hypophyse, was den Angaben der Literatur entspricht (18).

4.2.1.6. Prl tritt ebenfalls in zwei immunoreaktiven Formen in Erscheinung: "big" Prl wird bei KAV 0,16 und Prl bei KAV 0,47 eluiert. Wir massen 0,48 mE Prl / Hypophyse (55).

Die übrigen HVL-Hormone wurden von uns nicht bestimmt.

4.2.2. Die Immunoidentität des TSH aus Hypophysenüberständen

TSH aus Hypophysenüberständen verhält sich in Verdünnungen in Puffer B wie TSH aus menschlichem Serum. Es wurden Fraktionen aus zwei verschiedenen Elutionen über Sephadex G-100 verdünnt. Die Verdünnungskurven verhielten sich identisch.

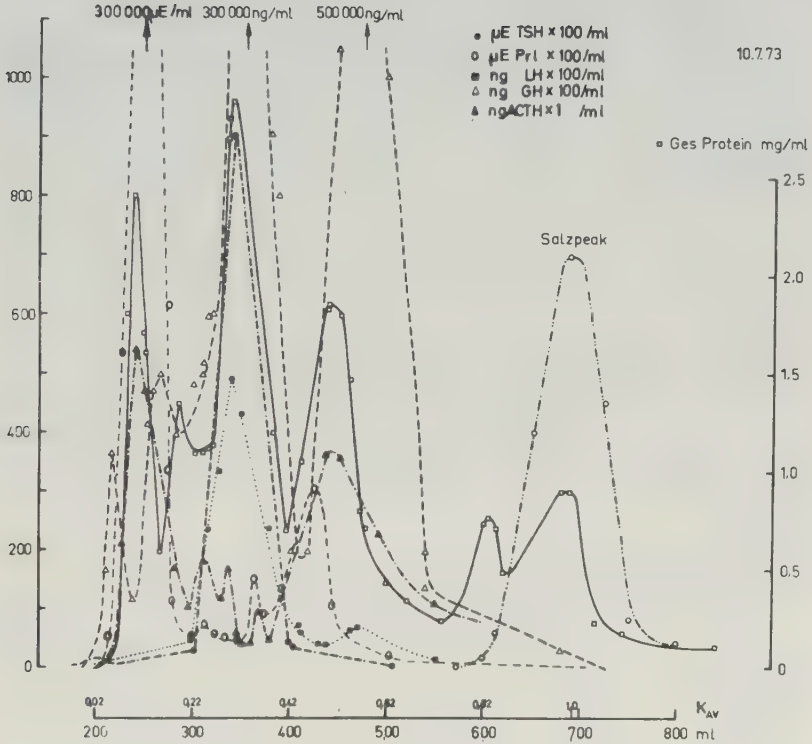


Abb. 10: Hormonverteilung im Eluat eines Hypophysenextraktes nach Chromatographie über Sephadex G-100.
 G-100 Säule 115 cm lang, Innendurchmesser 3 cm, KAV 0 = 190 ml, KAV 1 = 690 ml; Elutionsmedium: Puffer C mit 0,02 % Natriumacid pH 7,4. Elutionstemperatur: 4 °C; Elutionszeit: 1 KAV (690 ml) = 124,4 Std.

Tab. 11 : Die Einzelwerte der Verdünnungen des TSH aus Hypophysenüberständen.

Der Mittelwert für die Winkel der Fraktionen liegt bei $140,5^{\circ}$ für 4 verdünnte Werte und weicht damit um $1^{\circ} = 1,1 \%$ von der gemittelten Eichkurve ab.

Verdünnt wurde:	Fraktion 38 (Serie Z) = KAV 0,036 840 μ E TSH					
Verdünnung	:	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320
Gemessen	:		21	10,8	5,1	2,5
Berechnet	:	40	20	10	5	2,5
Winkel der Verdünnungskurve mit der Abszisse:						141° .

	Fraktion 40 (Serie Y) = KAV 0,06 1 900 μ E TSH			
Verdünnung	:	1:200	1:400	1:800
Gemessen	:	9,5	3,8	1,8
Berechnet	:	8,4	4,2	2,1
Winkel der Verdünnungskurve mit der Abszisse:				138° .

	Fraktion 68 (Serie Z) = KAV 0,318 17 000 μ E TSH = 17 mE TSH				
Verdünnung	:	1:1000	1:2000	1:4000	1:8000
Gemessen	:	17	8,4	3,8	1,7
Berechnet	:	16	8	4	2
Winkel der Verdünnungskurve mit der Abszisse:					141° .

	Fraktion 90 (Serie Z) = KAV 0,6 43 μ E TSH					
Verdünnung	:	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160
Gemessen	:	21,5	14,2	7,6	4,2	2,1
Berechnet	:	30	15	7,5	3,7	1,8
Winkel der Verdünnungskurve mit der Abszisse:						142° .

V. DISKUSSION

Es gilt als ein in der Radioimmunologie anerkanntes Prinzip, dass eine für ein bestimmtes, als Standard verwandtes Antigen, radioimmunologisch gewonnene Eichkurve nur dann richtige Messwerte liefert, wenn eine Verdünnungskurve der Lösung, die das unbekannte, zu messende Antigen enthält, bei graphischer Auftragung parallel zur Standardeichkurve verläuft. Dieser Parameter: Parallelität von Standard und Verdünnungskurven ist in der Qualitätskontrolle radioimmunologischer Methoden eines der wichtigsten Kriterien für die Brauchbarkeit eines Radioimmunoassays. Nicht-Parallelität von Standard- und Verdünnungskurven bedeutet nämlich, dass das zu messende Antigen sich in seinen immunologischen Eigenschaften, z.B. in seiner Affinität zum spezifischen Antikörper, vom Standard unterscheidet. Ein chemisch optimierter Radioimmunoassay, der dem Kriterium der Parallelität von Standard und Verdünnungskurve zuverlässig entspricht, gestattet, Antigene zu erkennen, die in ihren immunologischen Eigenschaften vom eingesetzten Standard abweichen.

Abweichungen in der Parallelität von Standard und Verdünnungskurven können nun durch eine Reihe von Artefakten vorgetäuscht werden. So findet man beim TSH beim Vergleich standardisiert durchgeführter RIAs in Abhängigkeit vom eingesetzten $^{125}\text{J-TSH}$ als Tracer, dass Standardkurven in 4%igem Rinderalbumin-Puffer und gleichzeitig dazu angelegte Standardkurven in TSH-armem Serum (Wiederfindekurven) zwar meistens parallel verlaufen, zu oft jedoch findet sich die Wiederfindekurve nach links oder nach rechts von der Standardkurve verschoben wieder. Gelegentlich wurde auch beobachtet, dass Standard und Wiederfindekurve sich kreuzen oder dass Standardleerwert und die niedrigen Eichpunkte der Wiederfindekurve bezogen auf den Standardleerwert und die niedrigen Eichpunkte der Standardkurve in Rinderalbumin-puffer mehr als 100 % Bindung aufwiesen, d.h. es wurde am Nullpunkt im Serum mehr Radioaktivität gefällt, als im Albuminpuffer. Der Tracereffekt wird am besten dadurch ausgeglichen, dass die

zu messende Probe im gleichen Milieu bestimmt wird, wie der Standard. Bindungen im Serum über 100 % im Vergleich zum Standardpuffer bei der Doppelantikörpermethode sind meist auf nicht optimale Konzentrationsverhältnisse zwischen präzipitierendem Antikaninchen-Gammaglobulin und als Kopräzipitat zugesetztem Kaninchen-Gammaglobulin zurückzuführen und entsprechend durch sorgfältiges Austesten des Fällungssystems zu beseitigen (15). Um artifizielle Nicht-Parallelität von Standardkurven und Verdünnungskurven der zu messenden Proben in dieser Arbeit mit Sicherheit auszuschliessen, wurden die zu messenden Serumproben stets sowohl in 4 %igem Rinderalbumin-Puffer als auch in nahezu TSH-freiem Humanserum verdünnt. Ausserdem wurde in jedem Durchgang eine Standardkurve in Rinderalbumin-Puffer wie auch in Nullserum angelegt. Schliesslich wurden sämtliche Radioimmunoassays wiederholt, bei denen keine Parallelität der Standardkurven im Puffer und im Nullserum zu erzielen waren. In jedem Durchgang wurden schliesslich Kontrollwerte von drei Poolseren im Bereich von einer, zwanzig und fünfzig Mikroeinheiten TSH per ml mitgeführt. Bei dieser strengen Qualitätskontrolle unseres Radioimmunoassays für TSH konnte weder in einem der Patientenseren noch in einer Fraktion eines chromatographisch aufgetrennten Hypophysenextrakts eine signifikante Abweichung in der Parallelität der verdünnten Probe von den Standardkurven nachgewiesen werden (siehe 4.1.4.1. und 4.1.4.2.). Ähnliche Ergebnisse erhielten KIOSHI MIYAI et al. (30) beim Vergleich von hypophysärem TSH und Serum-TSH mit Standard-TSH-Präparationen. DIAMOND und ROSEN fanden chromatographisch Differenzen zwischen hypophysärem und zirkulierendem TSH (13).

Bei der Sephadex G-100 Chromatographie der Überstände von zentrifugierten Hypophysenextrakten fanden sich bei KAV 0,01 (also etwa im Ausschlussvolumen) ca. 4 % der TSH-Aktivität und bei KAV 0,3 ca. 96 % der TSH-Aktivität im Eluat. In Ver-

dünnungskurven verhielt sich das TSH aus dem Vorpeak parallel zum TSH aus dem Hauptpeak und zu TSH-Standardpräparationen. Obwohl hier eine TSH-Fraktion aufgezeigt werden konnte, die auf Grund ihres Wanderungsverhaltens an Sephadex G-100 ein bedeutend grösseres Molekulargewicht aufweisen muss als TSH des Hauptpeaks, konnte auch hier bezogen auf die Parallelität der Verdünnungskurven nur Immunoidentität nachgewiesen werden. Daraus muss der Schluss gezogen werden, dass als Parallelität von Standard und Verdünnungskurven definierte Immunoidentität noch kein ausreichendes Indiz für die Homogenität eines Antigens, hier von hTSH ist.

In den Eluaten der Sephadex-Chromatographie wurde neben TSH auch noch hGH, ACTH, LH und Prolactin radioimmunologisch bestimmt. LH erschien im Elutionsvolumen des TSH. Die Proteohormone GH, ACTH und Prl bildeten mehrere immuno-reaktive Fraktionen: Prl und ACTH eluierten in zwei immuno-reaktiven Sammelfraktionen und waren zu 90 % vom TSH abtrennbar. GH eluierte in drei Fraktionen, das sogenannte "big"-GH (etwa 20 %) eluierte dabei zusammen mit TSH und LH.

6. ZUSAMMENFASSUNG

1. Nach der Doppelantikörpermethode (14) wurde hTSH in Patientenseren und in Fraktionen über Sephadex G-100 chromatographierter Hypophysenextrakte radioimmunologisch bestimmt.

2. Die Qualitätskontrolle des TSH-Radioimmunoassays wurde mit Hilfe von Wiederfindekurven in TSH-armem Serum sowie durch Kontrollseren durchgeführt. Ein Assay wurde nur dann als zuverlässig erachtet, wenn Standardkurve und Wiederfindekurve parallel verliefen, und die Kontrollwerte im erwarteten Bereich lagen.

3. Wiederholtes Einfrieren TSH-haltiger Seren sowie Hämolyse zeigte keinen Einfluss auf die Meßwerte.

4. Elf Patienten wurden mit 1000 µg TRH über vier Stunden infundiert. TSH wurde vor der Stimulation sowie 30, 90, 120, 180, 240, 260 Minuten nach Infusionsbeginn im Serum in jeweils mindestens vier Verdünnungen gemessen.

5. TSH reagierte in allen Fällen immunoidentisch mit einem VK von 1,3 %, berechnet aus der Steigung der Standardkurven in der Logit-log-Darstellung. Die TSH-Basalwerte lagen bei $1,7 \pm 1,0$ µE TSH/ml ($\bar{x} \pm 2s$). 30 Minuten nach Stimulation mit TRH bei $9,6 \pm 4,4$ µE TSH/ml ($\bar{x} \pm 2s$) und 180 Minuten nach Stimulation mit TRH bei $20,2 \pm 7,2$ µE TSH/ml ($\bar{x} \pm 2s$). Nach 3 Stunden waren die Patienten nicht weiter stimulierbar (siehe Abbildung 5). Die Mittelwerte entsprechen in etwa den Angaben der Literatur (14, 17).

6. Bei einem Fall präklinischer Hypothyreose lag der 3-Stunden-Wert mit 36 µE TSH deutlich über der Norm. Auch hier Parallelität der Verdünnungskurven.

7. In flüssigem Stickstoff tiefgefrorene Hypophysen wurden zerstossen, mit 0,015 mol Phosphatpuffer pH 7,4 eluiert und der Überstand nach dem Zentrifugieren über 130 x 3 cm Sephadex G-100 bei 4° C chromatographiert. Im Eluat konnte bei KAV 0,01 (etwa Ausschlussvolumen) ca. 4 % der eingesetzten TSH-Aktivität ("big"-TSH) und bei KAV 0,3 ca. 96 % TSH-Aktivität radioimmunologisch nachgewiesen werden. Beide Fraktionen liefen in Verdünnungskurven parallel zur Standardkurve, obwohl das TSH der Vorfraktion sich vom TSH des Hauptpeaks in seinem Molekulargewicht offensichtlich stark unterschied.

8. In verschiedenen Assays gefundene Nicht-Parallelität zwischen Standardkurve bzw. Wiederfindekurve und Verdünnungskurven der zu messenden Proben konnten stets auf Artefakte zurückgeführt werden und liessen sich nicht reproduzieren. Es wurde in keinem Fall eine Nicht-Parallelität von Standard und Verdünnungskurve gefunden, die auf fehlende Identität zwischen TSH-Standardpräparation und endogenem TSH vor oder nach TRH-Stimulation bzw. direkt aus Hypophysen zurückzuführen gewesen wäre.

7. LITERATUR

1. BAUGH, C.M., C.KRUMDIECK, J.M.HERSHMAN, and J.A.PITTMAN:
Synthesis and biological activity of thyrotropin releasing hormone.
Endocr. 87, 1015 (1970)
2. BETHGE, H., W.WILDMEISTER, and F.A.HORSTER:
Plasma Cortisolspiegel nach intravenöser Injektion von Thyrotropin releasing Hormon (TRH) beim Menschen.
Klin.Wschr. 50, 211 (1972)
3. BØHLER, J., F.ENZMANN, K.FOLKERS, C.Y.BOWERS, and A.V.SHALLY:
The identity of chemical and hormonal properties of the thyrotropin releasing hormone (TRH) and pyro-glutamyl-prolinamide.
Biochem.Biophys.Res.Comm. 37, 705 (1969)
4. BLÜMEL, K.:
Bestimmung von T_3 absolut im Serum.
In Vorbereitung.
Med. Fakultät d.Univ. München.
Dissertation.
5. BOWERS, C.Y., H.G.FRIESEN, P.HWANG, H.J.GNYDA, and K.FOLKERS:
Prolactin and thyrotropin release in man by synthetic pyro-glutamyl-histidyl-prolinamide.
Biochem.Biophys.Res.Comm. 45, 1033 (1971)
6. BOWERS, C.Y., A.V.SHALLY, F.ENZMANN, J.BØHLER, and K.FOLKERS:
Porcine thyrotropin releasing hormone in (pyro)-glu-his-pro(NH_2).
Endocr. 86, 1143 (1970)
7. BÜTTNER, J., and D.STAMM:
Qualitätskontrolle klinisch-chemischer Untersuchungen.
Z.Klin.Chem. 6, 303 (1966)
8. BURGUS, R., T.F.DUNN, D.DESIDERIO, D.N.WARD, W.VALE, and R.GUILLEMIN:
Characterization of ovine hypothalamic hypophysiotrophic TSH-releasing factor (TRF)
Nature 226, 321 (1970)

9. BURR, J.M., D.B.GRANT, P.C.SIZONENKO, S.L.KAPLAN, and M.M.GRUMBACH:
Some critical factors in double antibody radioimmunoassay systems utilizing sheep-anti-rabbit-precipitating-sera for measurements in human serum LH, FSH and hGH.
J.Clin.Endocr. 29, 948 (1969)
10. CATT, K.J.:
Radioimmunoassay with antibody-coated discs and tubes.
Acta Endocrin. Suppl. 142, 222 (1969)
11. DUCOMMUN, P., E.SAKIZ, and R.GUILLEMIN:
Increase of plasma TSH concentration following injection of purified hypothalamic thyrotropin release hormone.
Endocrin. 77, 792 (1965)
12. DELANGE, F., J.M.HERSMAN, A.M.ERMANS:
Circulating thyroid hormones in endemic goiter.
J.Clin.Endocrin. 34, 891 (1972)
13. DIMOND, R.C., and S.W.ROSEN:
Chromatographic differences between pituitary and circulating thyrotropin. Walter Reed Army Institute of Res. Wash.D.C. and Clin.Endocrin. NIAMD, NIH Bethesda Md. 55th Annual meeting Endocrin.Soc.Chicago, 1973.
14. ERHARDT, F., I.MARSCHNER, R.C.PICKARDT, und P.C.SCRIBA:
Verbesserung der Qualitätskontrolle der radioimmunologischen Thyreotropinbestimmung.
Z.Klin.Chem.Klin.Biochem. 9, 50 (1973)
15. ERHARDT, F., und P.C.SCRIBA:
Probleme der radioimmunologischen hTSH-Bestimmung.
Ärztl.Labor 20, 191 (1974)
16. ERHARDT, F., J.HENNER, I.MARSCHNER, and P.C.SCRIBA:
Technik der radioimmunologischen Bestimmung von TSH.
In: Nuclearmedizin 418 (1975)
F.U.Schattenauer Verlag.
17. FOLEY, T.P., J.OWINGS, J.T.HAYFORD, and R.M.BLIZZARD:
Serum thyrotropin responses to synthetic thyrotropin releasing hormone in normal children and hypopituitary patients.
J.Clin.Invest. 51, 431 (1972)

18. GLICK, S.M., J.ROTH, R.S.YALOW, S.A.BERSON:
The regulation of growth hormone secretion.
Recent Progr.Hormone Res. 21, 241 (1965)
19. GOLSTEIN GOLLAIRE, J., and L.VANHÄLST:
Influence of iodinated thyrotropin on the
sensitivity of the radioimmunoassay.
Internat.J.Appl.Radiat.Isotope 21, 17 (1970)
20. GOTSMANN, M.:
Probleme der radioimmunologischen hGH-
Bestimmung.
Dissertation, 1973
Mediz.Fakultät der Universität München
21. GREENWOOD, F.C., J.LANDON, and T.C.B.STAMP:
The plasma sugar, freefaty acide, cortisol
and growth hormone response to insulin.
I. In control subjects.
J. Clin. Invest. 45, 429 (1966)
22. GREENWOOD, F.C., W.M.HUNTER, and J.S.GLOVER:
The preparation of ¹³¹Iod labeled human
growth hormone of high specific radio-
activity.
Biochem. J. 89, 114 (1963)
23. GUILLEMIN, R.:
Hypothalamic control of the secretion of
adeno-physical hormones.
In: Advances in metabolic disorders.
Eds.: R.Levine and R.Luft,
Academic Press, New York-London 2 (1971)
24. HABERMANN, J.:
Kompetitive Proteinbindungsanalyse für
T₃ und T₄. Anwendung für die getrennte
Bestimmung von T₃ und T₄ im Serum.
Dissertation.
Medizinische Fakultät der Universität München,
1974
25. HALL, F., J.AMOS, and B.J.ORMSTON:
Radioimmunoassay of human serum thyrotropin.
Brit.med.J. 1, 582 (1971)
26. HEISLER, E.D., J.A.PITMAN, J.M.HERSHMAN and
C.M.BOUGH:
Direct evaluation of pituitary thyrotropin
reserve utilizing synthetic thyrotropin
release hormone.
J.Clin.Endocrin. 33, 573 (1971)
27. HORN, K., T.RUHL, and P.C.SCRIBA:
Semiautomatic method for the separation and
determination of total trijodthyronine and thy-
roxine in serum.
Z.Klin.Chem. 10, 99 (1972)

28. HUNTER, W.M.:
The preparation and assessment of
iodinated antigens in radioimmunoassay
methods.
Eds.: E.Kirkham and W.M.Hunter,
Churchill, Livingston, Edinburgh, London,
p. 3 (1971)
29. INGBAR, S.H., and N.FREINKEL:
Regulation of the peripheral metabolism
of the thyroid hormones.
Recent.Progr.Hormone Res. 16, 353 (1960)
30. KIYOSHI MIYAI, MINORU FUKUCHI and YUICHI KUMANHARA:
Correlation between biological and immuno-
logical potencies of human serum and
pituitary TSH.
Osaka Jap.J.Clin.Endocrin. 29, 1438 (1969)
31. KUTSCHINSKY, G., und F.H.LÜLLMANN:
Thyreotropes Hormon.
In: Kurzes Lehrbuch der Pharmakologie,
p. 183.
Thieme-Verlag, Stuttgart, 1973.
32. LIAO, J.G.T., S.M.HOWARD, B.SHOME, and J.S.CORNELL:
Studies on the structure of thyrotropin:
Its relationship to luteinizing hormones.
Recent.Progr.Hormone Res. 27, 165 (1971)
33. LIDDLE, G.W., D.ISLAND, and C.K.MEADOR:
Normal and abnormal regulation of cortico-
tropin secretion in man.
Recent.Progr.Hormone Res. 18, 125 (1962)
34. LUDBERG, P.C., J.WALINDER, I.WERNER, and L.WIDE:
Effects of thyrotropin releasing hormone
in plasma levels of TSH, FSH, LH and GH in
anorexia nervosa.
Eur.J.Clin.Invest. 2, 150 (1972)
35. MIRONZE, J., C.JAFFIOL, R.PASTORELLO, et L.BALDET:
Nouvelle technique d' étude du métabolisme
des hormones thyroïdiennes ($^{125}\text{T}_4$, $^{131}\text{T}_4$).
Données expérimentales et cliniques.
Ann.d.Endocr. 28, 445 (1967)
36. MITTLER, J.C., T.W.REDDING, and A.V.SHALLY:
Stimulation of thyrotropin secretion by
thyrotropin releasing hormone in organ
cultures of anterior pituitary.
Proc. Soc. Exp. Biolog. (N.Y.) 130, 406 (1969)

37. MORGAN, C.R., and A.LAZAROW:
Immunoassay of insulin using a two
antibody system.
Proc.Soc.Exp.Bio.Med. 110, 29 (1962)
38. ZUR MÜHLEN von A., R.D.HESCH, D.EMRICH, and
W.D.CREUTZFELDT:
Wirkungen von synthetischem "Thyrotropin
releasing Hormon" auf Plasmaspiegel von
thyreotropem Hormon und Wachstumshormon
bei Gesunden, Patienten mit Hyperthyreose
und Hypothyreose.
Dtsch.Med.Wschr. 95, 2623 (1970)
39. ZUR MÜHLEN von A., D.EMRICH, R.D.HESCH, and
J.KÖBBERLING:
Untersuchungen über die Beeinflussung
der Thyreotropininkretion beim Menschen.
Acta Endocrin. (Kbh.) 68, 669 (1971)
40. ZUR MÜHLEN von A., und D.EMRICH:
Zur Methode der radioimmunologischen
Bestimmung vom menschlichen TSH.
Z.Klin.Chem. 9, 257 (1971)
41. NARS, P.W., M.STAHL, M.DAMBACHER et al.:
On the use of peptidase inhibitor (Trasylol)
for storage of ¹²⁵I Jodin-labeled peptid-
hormones (hGH, TSH, ACTH, Insulin, Glucagon
and PTH).
Experimentia Basel 28 Nr. 2 213 (1972)
42. NUGENT, C.A., K.EIK-NES, H.S.KENT, L.T.SAMUELS,
and F.H.TYLER:
A possible explanation for Cushing syndrom
associated with adenal hyperplasia.
J.Clin.Endocrin. 20, 1259 (1960)
43. ODELL, W.D., J.F.WILBER, and R.D.UTIGER:
Studies of thyrotropin physiology by means
of radioimmunoassay.
Recent.Progr.Hormone Res. 23, 47 (1967)
44. ORMSTON, B.J., R.J.CRYER, R.GARRY, G.M.BESSER and
R.HALL:
Thyrotropin releasing hormone in a thyroid
function test.
Lancet II/10 (1971)
45. PATEL, Y.C., H.G.BURGER, and B.HUDSON:
Radioimmunoassay of serum thyrotropin:
Sensitivity and specificity.
J.Clin.Endocrin. 33, 768 (1971)

46. PICKARDT, C.R.:
Stimulation der TSH-Sekretion durch TRH
(Thyrotropin releasing Hormon): Diagnostische
Bedeutung und pathophysiologische Folgerungen.
Habilitationsschrift.
Universität München, 1973.
47. PICKARDT, C.R., F.ERHARDT, J.GRÜNER, H.G.HEINZE, K.HORN,
und P.C.SCRIBA:
Stimulierbarkeit der TSH-Sekretion durch TRH
beim autonomen Adenom der Schilddrüse.
Dtsch.Med.Wschr. 97, 3031 (1973)
48. PIERCE, J.G., Eli Lilly Lecture:
The subunits of pituitary thyrotropin, their
relationship to other glykoproteid hormones.
Endocrin. 89, 1331 (1971)
49. PIERCE, J.G., T.H.LIAO, S.M.HOWARD, B.SHOME, and
J.C.CORNELL:
Studies on the structure of thyrotropin:
Its relationship to luteinizing hormone.
Recent.Progr.Hormone Res. 27, 165 (1971)
50. REICHERT, L., L.JUNIOR, and A.E.WILHELMI:
A summary of biological activities of the
various lots of pituitary hormones produced
under the programs of the national institute
of arthritis metabolism and digestive diseases.
Endocrin. 92, 1301 (1973) Atlanta Georgia
51. RODBARD, D., P.L.RAYFORT, and G.T.ROSS:
Statistical quality control of radioimmunoassays
In: Statistics in Endocrinology.
Eds.: J.W.McArthur and Th.Colton).
The M.I.T.Press Cambridge London, p.411 (1970)
52. ROSA, V.:
A method of protein labelling with radiojodine.
In: Nuklearmedizin, Beilage zur Atompraxis.
Heft 6 (1966).
53. SCHALLY, A.V., C.Y.BOWERS, and T.W.REDDING:
Presence of thyrotropin release hormone in
porcine hypothalamus.
Proc.Soc.Exp.Biolog. 121, 718 (1966)
54. SHOME, B., and A.F.PARLOW:
Human TSH subunits: Radioimmunoassay and
primary structure of the β -subunit.
Department of Ob.Gyn.VCLA-School of Medicine:
Harbour General Hospital Campus Torrance,
Cal. 90509, USA.
55th Annual Meeting Endocrin.Soc.Chicago/Ill.,
1973.

55. SINHA, Y.N., F.W.SELBY, U.J.LEWIS, and W.P.VANDERLAAN:
A homologous radioimmunoassay of human prolactin.
Division of Endocrinology, Scripps Clinic and Research Foundation, La Jolla, Cal., USA.
56. SCRIBA, P.C., K.von WERDER, und K.SCHWARZ:
Hypothalamus und Hypophyse.
In: Siegenthaler W.
Klin.Pathophysiologie, p.298, 2. Auflage.
G. Thieme Verlag, Stuttgart.
57. SCRIBA, P.C., H.BROWZAK, F.ERHARDT, J.GRÜNER, J.HABERMANN, H.G.HEINZE, K.HORN, C.R.PICKARDT, M.RETTIG, und T.RUHL:
Totalserum T_3 and T_4 , TSH response to TRH stimulation in patients with endemic goiter.
Int.Symposium d.endemischen Kropfes, Innsbruck, 1972.
58. SCRIBA, P.C., und K.SCHWARZ:
Endokrinologie für die Praxis.
München, Lehmann-Verlag, 1970.
59. SOUVATZOGLOU, A.:
Zur klinischen Bedeutung der radioimmuno-
logischen LH-Bestimmung und der Stimulation der LH-Sekretion.
Habilitationsschrift.
Med. Fakultät der Universität München, 1972.
60. UTIGER, R.D.:
Radioimmunoassay of human plasma thyrotropin.
J.Clin.Invest. 44, 1277 (1965)
61. VOIGT, K.H., H.L.PHEMUND, and E.F.PFEIFFER:
Production of antibodies to ACTH for use in radioimmunoassay.
Horm.Metab.Res. 3, 312 (1971)
62. WERDER, von K., M.GOTSMANN, A.SOUVATZOGLOU, P.BOTTERMANN, und K.SCHWARZ:
Growth hormone and growthhormonelike immunoreactivity in man.
Acta Endocrinol. (Kbh.) Suppl.159, 43 (1972)
63. YALOW, R.S., and S.A.BERSON:
Immunoassay of endogenous plasma insulin in man.
J.Clin.Invest. 39, 1157 (1960)

Lebenslauf

Am 2. Juni 1949 wurde ich als Sohn des Arztes Dr. Richard May und seiner Gemahlin, der Ärztin Dr. Gertrud May geb. Ruperti in Kreuth am Tegernsee, geboren. Ich bin der Älteste von vier Geschwistern.

Vier Jahre lang besuchte ich die Grundschule in Kreuth, dann sechs Jahre lang den humanistischen Zweig des Gymnasiums in Tegernsee. Die Oberstufe absolvierte ich am Nymphenburger Gymnasium in München, wo ich 1969 die Reifeprüfung ablegte.

Im Wintersemester 1969/70 begann ich an der Ludwig-Maximilians-Universität in München das Medizinstudium und legte im Sommersemester 1970 das Vorphysikum und im Wintersemester 1971/72 das Physikum ab.

Im Wintersemester 1974/75 legte ich das Staatsexamen an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München ab.

